

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### LES ÉPREUVES DITES « BIOCHIMIQUES » (ACTIONS ENZYMATIQUES ET RÉSISTANCE A DES AGENTS INHIBITEURS) POUR L'IDENTIFICATION DES STREPTOCOQUES

#### I. — MÉTHODES

par R. WAHL et P. MEYER (\*) (\*\*).

(*Institut Pasteur*)

A côté des tests culturels et hémolytiques, les épreuves de fermentation et de résistance à divers agents inhibiteurs (chimiques ou physiques) appliquées aux streptocoques ont fait l'objet de multiples travaux depuis plus de soixante ans. Maintenant que les tests sérologiques ont pris la première place, il nous paraît utile d'essayer de délimiter celle qui reste à ces épreuves dites « biochimiques ».

Certaines avaient déjà été utilisées dès 1870 par Nepveu [82] à propos de l'érysipèle, puis par Koch [65], Rosenbach [94], et par Doleris [31] à propos de la fièvre puerpérale.

La première étude « biochimique » d'ensemble est due à Gordon [38, 39], à la suite des essais de von Lingolsheim [126]. Andrewes et Horder [1] exposent les premières différenciations

(\*) La bibliographie sera publiée ultérieurement avec la troisième partie.

(\*\*) Société Française de Microbiologie, séance du 1<sup>er</sup> mars 1956.

d'espèces (1) et de variétés (*Str. salivarius*, *Str. equinus*, *Str. hemolyticus*, *Str. mitis*) par les réactions « biochimiques ».

Ce fut le point de départ de nombreuses classifications dues à Floyd et Wolbach [35], Holman [56], Winslow [133], Broadhurst [14, 15] (qui décrit *Str. bovinus*, identique à *Str. bovis* d'Orla-Jensen); Hare [49]; Hare et Maxted [50]; Hopkins et Lang [59]; Beatie et Yales [9]; Burnet et Weissenbach [19]; Lyall [73]; Chryssowergis [20]; Mandelbaum [76]; Fuller et Armstrong [37]; Winslow et Palmer [134]; plus récemment, des classifications de Sherman [105, 106, 107], de Cotoni [23] et de Seeleman [103], ainsi que des travaux d'ensemble de Ritzler-Feld [90], Forgeot [36] et de Roemer [92].

Parallèlement, il y eut des études « biochimiques » limitées à certaines espèces ou catégories : celles de Sherman et coll. pour *Str. faecalis* [113], *Str. zymogenes* [114], *Str. salivarius* [95, 111], *Str. durans* [116], *Str. cremoris* [136], *Str. equinus* [55], et pour les streptocoques des groupes A et B [108 et 109]; celles de Guthof [46] pour *Str. salivarius*; de Wright [135] pour *Str. thermophilus*; de Mirick, Thomas, Curnen et Horsfall [81] pour *Str. M. G.*; de Long et Bliss pour les streptocoques du groupe F [72]; les études de Thiercelin [122], de Schmitz [98], de Meyer et Schoenfeld [80], de Henneberg [53], de Nyman [84] et de Skadhauge [118] sur les « entérocoques »; celles d'Orla-Jensen [85] sur les streptocoques du lait; de White et Niven (*Str. s. b. e*) [131] et de Sikl et Wagner [117] sur ceux des endocardites; enfin les travaux de Plastring et Harstell [87] (*Str. d'origine bovine*); de Laughton [69] (*Str. d'origine canine*, des groupe G, L et M); de Klimmer et Haupt [64] (streptocoques de divers animaux).

Notre étude est basée sur l'examen de 600 souches de streptocoques d'origines diverses et de presque toutes les espèces, dont 411 ont été soumises à la série complète des tests et figurent dans notre statistique.

1° Espèces appartenant aux groupes sérologiques :

A : *Str. pyogenes*; B : *Str. agalactiae*; C : *Str. equi*; *Str. C* animal; *Str. C* humain; D : *Str. faecalis* et ses variétés *zymogenes*, *hemolyticus* et *liquefaciens*; *Str. foecium*; *Str. bovis*; *Str. durans*; E, F, G, H, K, L et M.

2° Espèces non groupables : *Str. salivarius*; *Str. sanguis*; *Str. M G*; *Str. mitis*.

N'ayant cependant examiné que peu de représentants de *Str. equi*, de *Str. durans*, de *Str. M G* et des streptocoques du groupe N (*lactis* et *cremoris*), nous n'en donnerons pas les caractéristiques.

(1) Marmorek [78] avait affirmé l'« unité des streptocoques pathogènes pour l'homme ».

tères dans notre statistique. Dans la discussion nous confrontons nos quelques résultats pour ces dernières espèces avec les observations de la littérature.

Nous n'avons pas étudié les streptocoques *uberis*, *thermophilus* et *acidominus*.

### Techniques.

Il nous paraît nécessaire de préciser nos techniques, car il existe entre les travaux publiés des contradictions dues à l'utilisation de techniques non standardisées et parfois insuffisamment étudiées.

#### I — FERMENTATIONS.

1° CHOIX DU MILIEU. — Nous avons utilisé un milieu liquide de base autoclavé : eau peptonée à 5 p. 100, à pH 7,5 (E. P.) auquel on ajoute stérilement à la pipette les glucides à étudier, de façon à les obtenir à la concentration finale de 0,50 p. 100 pour la plupart, de 1 p. 100 pour le mannitol et l'amidon. Certains auteurs n'ont pas employé les mêmes concentrations pour tous les glucides (Gordon) ; d'autres sont allés jusqu'à 2 p. 100.

Nous avons employé : lactose, maltose, saccharose, mannitol, sorbitol, tréhalose, raffinose, inuline, glycérol, arabinose, xylose, amidon soluble.

Différents milieux de base avaient été essayés en vue de définir la formule optima, réalisant sans addition de glucides une culture positive sans acidification.

L'addition d'autres éléments : macération de viande, ascite, sérum à l'eau peptonée, a été, en principe, rejetée parce qu'ils apportent en particulier du glucose. Dans cette catégorie rentrent les milieux de Hiss, employés encore souvent pour l'inuline (Seeleman, par exemple) et autrefois généralisés par Lyall [73] à tous les glucides ; le mélange d'ascite, bile et inuline de Birkhaug [41], etc. De plus, le sérum a un autre inconvénient : il contient des enzymes ou proenzymes (d'ailleurs thermolabiles) capables d'hydrolyser des sucres comme le maltose, le glucose, ainsi que l'a démontré Broeck [16].

Cependant, nous avons été, dans certains cas exceptionnels, amenés à ajouter du sérum parce que, pour certaines espèces, la lenteur du démarrage est gênante dans l'utilisation pratique de l'épreuve qui, comme nous le verrons, ne doit pas être prolongée trop longtemps.

C'est pourquoi, si le démarrage ne s'est pas produit après vingt-quatre heures, nous le déclenchons par addition de sérum humain normal, à raison de 0,2 ml pour 5 ml. Le sérum, le moins pigmenté possible, pour ne pas gêner l'observation du virage, est filtré et chauffé pour détruire les enzymes glycolytiques.



Nous n'employons pas le sérum de cheval parce qu'il est très pigmenté (jaune or) et que, mélangé au bleu de bromothymol, il donne au milieu une coloration jaune vert (sans variation de pH).

Le procédé de « désucration » du milieu par une culture de *E. coli*, avant l'adjonction du sucre à étudier, est également à rejeter, car il rend le milieu impropre à la culture de certaines souches. Cette méthode avait été utilisée par Stowell, Hiliard et Schlesinger [120] à la suite des travaux de Thro [123].

Ajoutons que le mécanisme des fermentations est plus complexe qu'il ne le paraît. Ainsi Crowley [25, 26] a montré que certains streptocoques peuvent fournir du maltose à partir de l'amidon, et d'autres glucides à partir du maltose.

2° CHOIX DE L'INDICATEUR DE pH. — Pour les épreuves de fermentation, le bleu de bromothymol a été employé de préférence à l'indicateur d'Andrade (fuchsine acide), au rouge de phénol ou au pourpre de bromocrésol, parce que son virage progressif entre des limites étroites (de pH 7,4 où il est encore franchement bleu, à pH 6,4 où il est jaune franc) a permis de suivre de façon précise le début de l'acidification.

Le virage est noté dans le tableau I et sur la figure 1 (2) de la façon suivante, permettant l'évaluation approximative du pH :

1° + = vert bleuâtre, pH 7,4 à 7,0.

2° ++ = jaune verdâtre, pH 6,9 à 6,5.

3° +++ = jaune franc, pH inférieur à 6,5.

Le chiffre 0 dans le tableau indique l'absence de fermentation du sucre en présence, avec ou sans croissance du germe.

Quand le virage est minimum (au vert bleuâtre) nous considérons la fermentation comme « douteuse ». Le virage au jaune verdâtre ou au jaune indique une fermentation franche.

Ces résultats ont été utilisés dans notre statistique de la façon suivante : on totalise les croix de toutes les souches de chaque groupe sérologique ou espèce et on calcule la moyenne (nombre moyen de croix) ; on arrondit au nombre entier le plus proche et ce nombre moyen est attribué à l'ensemble du groupe ou de l'espèce.

Nous avons fait entrer les résultats douteux dans notre statistique, mais en distinguant deux cas différents. Pour les espèces qui, en présence d'un glucide donné, produisent tantôt une fermentation franche, tantôt une fermentation « douteuse », nous avons tenu compte de cette dernière dans le calcul de la moyenne statistique. Les espèces qui, en présence d'un glucide donné, ne donnent jamais de fermentation franche, et plus ou moins souvent



une fermentation « douteuse » (et sont donc notées par une seule croix), sont considérées comme ne fermentant pas réellement ce glucide.

3° ENSEMENCEMENT. — On ensemence 11 gouttes d'une culture de dix-huit heures en milieu à l'extrait de viande glucosé tamponné (milieu E. G. T.) dans 5 cm<sup>3</sup> d'E. P. Un ensemencement plus large risquerait de modifier le pH avant la culture.

*Lecture et notation des résultats.* — La première lecture est faite au bout de vingt-quatre à trente-six heures d'incubation à 37° (c'est alors que l'on ajoute éventuellement du sérum, si la culture n'a pas démarré).

La deuxième, après quarante-huit heures et quelquefois soixante-douze heures d'incubation.

Ce sont les résultats de cette deuxième lecture qui ont été relevés. Nous ne tenons pas compte des modifications survenues après soixante-douze heures. En effet, elles sont dues à des enzymes adaptatifs, qui sont communs à beaucoup d'espèces et dont l'action se manifeste entre le quatrième et le dixième jour et plus. Skadhauge [118] est également de cet avis, en faisant cependant une exception pour la lecture (cinquième-sixième jour) de la fermentation du glycérol (exception que nous n'avons pas prise en considération).

## II. — AUTRES ACTIONS ENZYMATIQUES.

a) *La décomposition de l'esculine* a été étudiée en E. P. (3) à laquelle on ajoute peu avant l'emploi 1 p. 100 d'esculine (solubilisée à 80°) et 2 p. 100 de citrate de fer ammoniacal, stérilisés séparément. Il ne faut pas ajouter de sels biliaires au milieu à l'esculine, comme l'ont fait Meyer et d'autres [79, 80] en imitant le milieu de Harrison et van der Leek [51], réunissant esculine et taurocholate de Na (0,5 p. 100), utilisé pour *E. coli* et *S. typhi*, et celui de Rochaix [91]. Cette association ne convient pas pour les streptocoques, comme l'ont montré Gundel [44] et surtout Ehrisman [33], car elle fausse les résultats. En effet, beaucoup d'espèces de streptocoques sont inhibées par les sels biliaires, ce qui empêche leur action sur l'esculine de se manifester. Demeler [29] emploie un milieu à l'esculine auquel il ajoute un sel de fer après la culture seulement (sans en préciser toutefois la raison).

b) *L'hydrolyse de l'hippurate de Na* a été étudiée avec la technique de Ayers et Rupp [7] un peu modifiée. En effet, nous

(3) Même milieu de base que pour les fermentations et choisi pour les mêmes raisons.

avons étudié l'influence de différents facteurs dans la réaction (temps d'incubation de la culture, dose de réactif ajouté, temps de contact) en vue de déceler les causes des divergences de résultats relevés dans la littérature.

Nous avons constaté qu'en prolongeant de dix à quinze minutes le temps de contact du réactif avec le surnageant de la culture, et en plaçant ce mélange à  $+ 37^{\circ}$ , le précipité non spécifique se dissolvait plus complètement, de sorte que la persistance du précipité prenait plus de valeur en faveur d'une réaction positive.

c) *Recherche de la production d' $\text{NH}_3$*  [désamination de l'arginine] (Ayers et Mudge [6]). Elle a été faite en milieu à l'extrait de viande glycosé tamponné et hyperpeptoné à 4 p. 100 avec mise en évidence de l'ammoniaque à l'aide du réactif de Nessler, après quatre jours d'incubation.

Un milieu à l'arginine peut également être employé. Certains auteurs, comme Roemer [92], mettent l'ammoniaque en évidence à l'aide d'un réactif « hyperchloruré » contenant un indicateur, en présence de phénol, et sur une culture de quatre jours, décantée ou non. L'intensité du virage dans les bleus verts est comparée à un témoin.

d) *La culture en lait tournesolé.* — Le lait doit être frais, écrémé et, si nécessaire, neutralisé. Du choix d'une bonne teinture de tournesol dépend la valeur de la réaction. Trois éléments ont été observés : l'acidification avec virage du tournesol, la coagulation du lait, la réduction du tournesol en leuco-dérivé ; pour avoir une valeur, cette dernière doit être précoce, antérieure ou au moins contemporaine de la coagulation, comme l'ont montré Seeleman [403], Topley et Wilson [425], Henneberg [53] et Demeler [29].

### III. — ETUDE DE LA PRODUCTION DE MUCILAGES (DEXTRANE OU LÉVANE).

a) En milieu E. G. T. saccharosé à 5 p. 100, en aérobiose.

b) Sur gélose E. G. T. saccharosée à 5 p. 100, en anaérobiose.

Une étude comparative sur 50 souches nous a montré que les colonies prennent plus rapidement leur aspect typique (quarante-huit heures au lieu de trois ou quatre jours) en anaérobiose qu'en aérobiose. En milieu liquide ces conditions sont sans influence.

### IV. — AGENTS INHIBITEURS.

1° *Le lait contenant 0,1 ou 0,02 p. 100 de bleu de méthylène.* — Le lait doit être également frais, écrémé et neutralisé, et le mélange avec le bleu doit être fait immédiatement avant l'ensemencement. La conservation du lait même à  $+ 4^{\circ}$ , et surtout en

tubes non capuchonnés est à éviter, car il faut craindre une concentration, même minime du bleu, par évaporation du mélange.

2° *Les milieux hypersalés à 6,5 p. 100 et à 2 p. 100 de NaCl.* — Nous utilisons le milieu E. G. T. hypersalé ; Sherman et Stark [412] ont employé une gélose lactosée hypersalée à 6,5 p. 100.

3° *Le milieu à pH 9,6* est tamponné au glycolle, selon Shattock, avec comme indicateur l'orthocrésolphtaléine (virage du rouge à l'incolore à pH 8,9) ajoutée au milieu avant l'ensemencement. Le pH du milieu doit être contrôlé avec l'électrode de verre.

4° *Gélose à 1/2 500 tellurite de K.* — Fleming [34] a montré que la sensibilité au tellurite de K (comparable à la sensibilité à la pénicilline) varie d'une espèce de streptocoques à l'autre, *Str. faecalis* étant le plus pénicillino- et tellurito-résistant. Bornstein [43], puis Skadhauge [418] ont utilisé cette propriété. Nous préparons le milieu E. G. T. gélosé additionné de tellurite de potassium autoclavé de façon à obtenir une concentration de 1/2 500.

5° *Bile et sels biliaires.* — Les résultats varient d'une part avec le milieu de culture, d'autre part avec la préparation de bile ou de sels biliaires utilisée. Il faut donc choisir judicieusement l'un et l'autre.

a) *Choix du milieu de culture.* — Il faut adopter un milieu standardisé (ce qui n'a pas été fait par les auteurs) pour avoir des résultats comparables entre eux. Citons parmi les milieux les moins recommandables : la gélose au sang de mouton avec de la bile bouillie (milieu de Belenky et Popowa [40]), la gélose à l'esculine (Meyer [79]) justement critiquée par Ehrisman [33] (comme il a été dit à propos de l'esculine), un milieu lactosé [44].

Dans le choix du milieu, il faut faire intervenir une notion qui n'a pas jusqu'ici attiré l'attention ; dans les préparations de bile et de sels biliaires existent, à côté des éléments inhibiteurs, des éléments nutritifs. C'est pourquoi nous avons fait les essais suivants :

Des doses croissantes (de 0 à 80 p. 100) de bile stérilisée par filtration ont été réparties :

En eau physiologique ; en milieu E. G. T. ; en E. P.

Des souches des groupes C, D (*Str. faecalis*), K et un *Str. sanguis* ont été utilisées pour tester ces diverses préparations.

Nous avons constaté que :

a) En eau physiologique, le seuil de concentration de bile pour l'inhibition est plus bas (*Str. C* ne pousse pas à 10 p. 100 de bile ; *Str. faecalis* pousse à peine à 25 p. 100 de bile).

Il semble donc que les facteurs nutritifs de la bile permettent à eux seuls une certaine croissance, mais à condition que la bile



ne soit pas trop concentrée. Au-dessus d'une certaine concentration de bile, les facteurs inhibiteurs l'emportent.

b) En milieu E. G. T., le seuil d'inhibition est le plus élevé (*Str. faecalis* pousse encore à 80 p. 100 de bile). Il semble que la vitesse de croissance des bactéries dans ce milieu très favorable l'emporte sur la vitesse de leur destruction par la bile.

c) En eau peptonée (milieu moins favorable que le précédent), le seuil d'inhibition est intermédiaire. En effet, le seuil est de 40 p. 100 bile pour *Str. faecalis* et de 10 p. 100 pour les streptocoques du groupe K.

D'après ces résultats nous avons choisi l'E. P. comme milieu standard. De cette façon seulement nous retrouvons les taux limites (de 10 à 40 p. 100) de la littérature, qui permettent une discrimination entre certaines espèces.

*Choix de la préparation de bile ou de sels biliaires.* — Les mêmes souches-tests ont servi à comparer les diverses préparations.

1° *La bile de bœuf liquide* à la concentration de 40, 30 et 10 p. 100 a été employée par la plupart des auteurs, tels que von Lingolsheim [426], Mandelbaum [76], Weissenbach [130], Kinyoun et Dieter [62], Sherman et Albus [108], Meyer et Schoenfeld [80], Gundel [44], Chryssowergis [20], Löwenberg [71].

Mais la composition de la bile est variable non seulement suivant l'espèce animale, mais aussi suivant les échantillons provenant d'une même espèce.

En outre, le mode de stérilisation intervient : l'autoclavage et même l'ébullition (employée par Belenky et Popowa) modifient l'action de la bile sur les cultures. Nous avons examiné 120 souches et nous avons obtenu des résultats comparables entre eux et avec ceux des sels biliaires en utilisant un stock de bile unique et stérilisé par filtration.

2° *Les préparations commerciales dites de sels biliaires.* — Elles ont aussi des inconvénients, car leur composition varie suivant les méthodes employées pour leur extraction et leur purification. De plus, même en utilisant toujours une préparation de même provenance, on n'obtient pas un produit constant.

Nous avons essayé trois préparations différentes de sels biliaires :

a) Un taurocholate de sodium partiellement purifié (Hoffmann-Laroche) ;

b) Un taurocholate de sodium très purifié (Hoffmann-Laroche) ;

c) Des sels biliaires très impurs (Prolabo).

Cette dernière s'est révélée inutilisable, comme donnant des résultats non reproductibles. Les deux premières ont donné des résultats satisfaisants et comparables entre eux, à condition de

les utiliser en E. P. (4). Des essais ont établi les concentrations équivalentes (par leur effet sur des souches-tests) aux concentrations de 10 p. 100 et de 40 p. 100 de notre stock de bile. Les concentrations respectivement équivalentes étaient 2,5 et 10 p. 100.

#### V. — RÉSISTANCE A DES TEMPÉRATURES DÉFAVORABLES.

a) Culture à 45° au bain-marie, pendant vingt-quatre heures ;  
b) Culture à 10° à l'étuve réfrigérée, pendant vingt-quatre à quarante-huit heures ;

c) Thermorésistance (trente minutes à 60° au bain-marie) [sur une culture de dix-huit heures en milieu E. V. G.].

Sherman et Stark [112] proposent de réaliser l'épreuve à 65°. Seeleman [102] la réalise en lait écrémé.

Ces épreuves ne sont fidèles que si la régulation de la température est parfaite (oscillations ne dépassant pas une fraction de degré).

#### RÉSUMÉ.

Nous avons essayé d'établir des règles pour le choix des réactifs, des milieux de culture et des techniques, après avoir analysé et discuté celles qui ont été utilisées par les auteurs.

Dans deux prochaines publications nous donnerons les résultats de notre statistique et nous essayerons de préciser la place qui revient à ces épreuves dans une méthode d'identification d'une souche de streptocoques.

#### SUMMARY.

The authors attempt to establish rules for the choice of reactivities, culture media and techniques, after having discussed the methods of previous workers.

In two future publications, they will expose the results of their statistics and discuss the value of these reactions for the identification of a Streptococcus strain.

(4) En milieu non nutritif on obtient une culture de quelques souches avec la première préparation, et aucune avec la seconde.

#### BIBLIOGRAPHIE

Elle sera publiée avec le troisième et dernier mémoire de cette série.

# ÉTUDE DES MODIFICATIONS DE LA FLORE INTESTINALE AÉROBIE DU NOURRISSON ET DU JEUNE ENFANT SOUS L'INFLUENCE DES ANTIBIOTIQUES

par G. MOUSTARDIER, J. BENTEGEAT et P. LE NOG (\*) (\*\*).

*(Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André  
et Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine  
de Bordeaux)*

Cette étude, dont les résultats ont été également rapportés dans la thèse de l'un de nous [6], a porté sur 96 enfants malades ayant reçu différents antibiotiques, après contrôle antérieur de la flore intestinale par coproculture, dont 80 enfants hospitalisés dans les services de médecine et de chirurgie infantile de l'Hôpital des Enfants et 16 enfants traités dans une pouponnière de l'Assistance publique.

Pour chaque antibiotique ou chaque association, nous avons étudié :

1° Les modifications bactériologiques globales des selles : richesse, répartition et prédominance de la flore ;

2° Les variations intéressant les coprocultures : rapport quantitatif des germes en culture, apparition ou disparition d'espèces par rapport au premier examen.

Les traitements antibiotiques, à doses moyennes, ont été, dans la majorité des cas, de longueur moyenne (six à douze jours). Seuls, 15 enfants sur 96 ont eu des traitements plus longs (quinze jours à deux mois).

Si, dans les traitements de courte durée, on ne note que quelques modifications, on observe, au contraire, des bouleversements plus grands de la flore dans les traitements de longue durée.

Nous n'avons jamais observé d'accidents cliniques graves au cours de ces traitements, même dans les traitements de longue durée, où les modifications de la flore intestinale étaient pourtant importantes.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 février 1956.

(\*\*) Les résumé et conclusions de ce Mémoire ont paru dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, 1956, 90, 494.



Nous avons cependant observé quelques épisodes diarrhéiques légers et fréquemment rencontré des selles molles, parfois désodorisées.

## I. — ANTIBIOTIQUES EMPLOYÉS SEULS.

1° PÉNICILLINE (8 cas). — Ces enfants avaient reçu de la pénicilline pendant une période de quatre à huit jours, aux doses journalières variant de 200 000 à 800 000 U. O.

a) *Modifications de la flore globale.* — Nous n'avons pas constaté de modifications très sensibles de cette flore. La richesse en germes et le rapport, entre eux, des bacilles Gram-positifs et Gram-négatifs et des cocci reste semblable après traitement. Dans 3 cas sur 8, nous avons cependant noté une diminution assez nette des bacilles Gram-positifs, bacilles peut-être sensibles à l'action de la pénicilline, diminution qui est plus perceptible après des traitements de durée moyenne (six à huit jours) qu'après des traitements de courte durée (trois à quatre jours).

b) *Modifications de la coproculture.* — La coproculture, après traitement, s'est montrée identique à celle faite avant traitement, dans 7 cas sur 8, sans modification de rapport quantitatif entre les entérobactéries, sans appauvrissement des coliformes, ni exaltation des *Proteus*.

Dans un seul cas, nous avons noté la disparition d'*Aerobacter aerogenes*, au deuxième examen, et l'apparition, sur milieu de Chapman, de staphylocoques dorés. Voici ce cas.

Suzanne M..., 800 000 U. O. de pénicilline en huit jours.

Avant traitement : *E. coli*, 6/10 ; *A. aerogenes*, 2/10 ; *P. rettgeri*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 des germes isolés ; Staphylocoques blancs +.

Après traitement : *E. coli*, 7/10 ; *P. rettgeri*, 2/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs et dorés, ++.

Nous n'avons enfin jamais noté l'apparition de *Candida albicans* ou son augmentation s'il existait déjà avant le traitement.

2° STREPTOMYCINE (10 cas). — Nous envisagerons les modifications observées en fonction de la durée du traitement.

A. — *Traitements de durée moyenne* (trois à dix jours).

a) *Modifications de la flore globale.* — L'appauvrissement de la flore intestinale est global, touchant aussi bien les germes Gram-positifs que les germes Gram-négatifs, mais cette flore reste à prédominance rouge, cependant plus touchée que la flore bleue. Le taux des germes Gram-positifs, par rapport aux germes Gram-négatifs, est plus important que dans les selles normales, bien que non prédominant. Ce sont surtout les cocci (entérocoques et

staphylocoques) qui augmentent par suite de la destruction par l'antibiotique de la plupart des bacilles Gram-positifs, sauf quelques rares espèces. Voici un exemple.

Serge L..., 1 an. Streptomycine, 0,50 g pendant huit jours.

*Avant traitement* : Flore rouge prédominante : bacilles Gram négatifs, 80 p. 100 ; bacilles Gram positifs, 10 p. 100 ; cocci, 10 p. 100.

*Après traitement* : Flore rouge prédominante, mais appauvrie : bacilles Gram négatifs, 60 p. 100 ; bacilles Gram positifs rares ; cocci, 40 p. 100.

b) *Modifications de la coproculture.* — Elles intéressent surtout le rapport quantitatif des germes de la flore rouge après isolement : diminution des colibacilles aux dépens d'un *Proteus* ou d'un *paracoli*. On note également une plus grande richesse de l'isolement en staphylocoques et en entérocoques. Voici un exemple.

Serge L..., 1 an. Streptomycine, 0,50 g pendant huit jours.

*Avant traitement* : *E. coli*, 7/10 ; *Paracoli aerobacter*, 1/10 ; *A. aerogenes*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs, +.

*Après traitement* : *E. coli*, 3/10 ; *P. aerobacter*, 3/10 ; *A. aerogenes*, 3/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs, + + +.

On retrouve les mêmes germes, avec un rapport quantitatif modifié : diminution des colibacilles au profit des autres espèces de coliformes.

B. — *Traitements de longue durée* (vingt à trente jours).

a) *Modifications de la flore globale.* — On trouve fréquemment une flore à prédominance bleue, constituée par deux sortes de germes en quantité variable : staphylocoques et entérocoques, rares bacilles Gram-positifs et levures en plus ou moins grande quantité. La flore rouge est pauvre et disséminée. Voici un exemple.

Qu..., vingt jours streptomycine à 0,50 g.

*Après traitement* : Flore bleue prédominante, 80 p. 100 ; Staphylocoques, 40 p. 100 ; Entérocoques, 20 p. 100 ; Levures, 20 p. 100 ; rares bacilles Gram positifs ; Flore rouge pauvre, 20 p. 100.

Les germes Gram-positifs prédominent nettement et les levures, du type *C. albicans*, sont en plus grande quantité qu'aux premiers examens.

b) *Modifications de la coproculture.* — On note, outre une augmentation des staphylocoques et des entérocoques, de grandes variations parmi les entérobactéries, caractérisées par une diminution, sans disparition complète, des colibacilles, dans 4 cas

sur 5, une diminution des autres coliformes ou leur disparition dans 3 cas sur 5 et l'apparition d'un *Proteus* dans 1 cas sur 5. On constate également l'apparition de pyocyaniques et de staphylocoques dorés dans 2 cas sur 5 et une grande extension des levures. Voici deux exemples.

Qu..., vingt jours de streptomycine à 0,50 g.

*Avant traitement* : *E. coli*, 7/10 ; *A. aerogenes*, 1/10 ; *P. vulgaris*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs et levures, +.

*Après traitement* : *E. coli*, 5/10 ; *P. vulgaris*, 4/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs, ++ ; Levures, +++ ; apparition de quelques colonies de *P. aeruginosa*.

Mon..., un mois de streptomycine à 0,50 g.

*Avant traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *A. aerogenes*, 1/10 ; *E. intermedium*, 2/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs, +.

*Après traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *E. intermedium*, 1/10 ; Entérocoques, 3/10 ; Staphylocoques blancs, +++.

3° CHLORAMPHÉNICOL (17 cas). — Nous distinguerons également les modifications dans les traitements de durée moyenne et de longue durée.

A. — *Traitements de durée moyenne* (trois à dix jours).

a) *Modifications de la flore globale*. — Elles sont identiques à celles observées après traitement par la streptomycine. Voici un exemple.

Alain G..., 3 mois. Tifomycine, 0,25 g par jour pendant dix jours.

*Avant traitement* : Flore rouge prédominante, riche : bacilles Gram négatifs, 70 p. 100 ; bacilles Gram positifs, 10 p. 100 ; cocci, 20 p. 100.

*Après traitement* : Flore rouge prédominante, appauvrie : bâcilles Gram négatifs, 60 p. 100 ; cocci, 40 p. 100 ; rares bacilles Gram positifs.

La flore reste à prédominance rouge, mais le taux des cocci augmente par rapport à celui qui existait avant traitement.

b) *Modifications de la coproculture*. — On retrouve les mêmes germes après le traitement, mais dans des rapports différents, en particulier diminution des colibacilles, au profit des *paracoli* et des *Proteus*, et augmentation des staphylocoques et des entérocoques. Voici un exemple.

Alain G..., 3 mois. Tifomycine, 0,25 g par jour pendant dix jours.

*Avant traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *P. vulgaris*, 2/10 ; *P. aerogenes*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques rares.

*Après traitement* : *E. coli*, 4/10 ; *P. vulgaris*, 3/10 ; *P. aerogenes*, 2/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs, ++.



B. — *Traitements de longue durée* (quinze à trente jours).

a) *Modifications de la flore globale.* — On constate une flore à nette prédominance bleue avec une diminution et un appauvrissement de la flore rouge. Voici un exemple.

Christ. T..., après deux mois de tifomycine : Flore bleue, prédominante, 80 p. 100 : Staphylocoques, 40 p. 100 ; Entérocoques, 40 p. 100 ; nombreuses levures. Flore rouge pauvre, 20 p. 100.

b) *Modifications de la coproculture.* — Bien que classiquement l'appauvrissement des selles en germes soit global et que l'équilibre entre les différentes espèces soit conservé (d'Agata [4]), nous avons fréquemment noté une diminution des colibacilles et leur remplacement par des *Proteus*. On constate fréquemment la disparition complète d'un germe, par suite de la meilleure sensibilité des entérobactéries à cet antibiotique.

Au cours de 8 traitements de longue durée, nous avons observé une diminution ou la disparition complète d'*E. coli* ou d'*E. intermedium* dans 3 cas sur 8 ; une diminution ou la disparition des *paracoli* dans 4 cas sur 8 ; l'augmentation des *Proteus* dans 2 cas sur 8, ou de staphylocoques dorés et de levures dans 3 cas sur 8. Voici deux exemples.

Liv..., pouponnière, huit jours de traitement à la tifomycine.

*Avant traitement* : *E. coli*, 4/10 ; *P. mirabilis*, 4/10 ; *P. intermedium*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques, +.

*Après traitement* : *P. mirabilis*, 4/10 ; *P. intermedium*, 2/10 ; Entérocoques, 4/10 ; Staphylocoques blancs et dorés, ++ ; quelques pyocyaniques.

Cl. Mal..., pouponnière, huit jours de tifomycine à doses moyennes.

*Avant traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *P. aerogenes*, 1/10 ; *A. aerogenes*, 1/10 ; *P. vulgaris*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10.

*Après traitement* : *E. coli*, 2/10 ; *P. vulgaris*, 4/10 ; *A. aerogenes*, 1/10 ; Entérocoques, 3/10.

4° GROUPE DES TÉTRACYCLINES. — Nous avons étudié 10 cas de traitement par chacun des trois antibiotiques du groupe (chlor-tétracycline, oxytétracycline et tétracycline).

Les deux flores rouge et bleue sont touchées, comme l'avaient déjà montré des travaux antérieurs.

Dans la flore rouge, il y a disparition des coliformes au profit souvent des *Proteus* ou des pyocyaniques.

Dans la flore bleue, il y a disparition des anaérobies Gram-positifs et d'une partie des entérocoques au profit de staphylocoques résistants, qui prolifèrent, et apparition et pullulation fréquente de levures.

Ces modifications de la flore ne s'observent que si les entérobactéries sont sensibles à ce groupe d'antibiotiques et, dans ces cas, la longueur du traitement n'intervient pas, car, même dans les traitements de courte durée (trois à quatre jours), nous avons constaté des bouleversements considérables de la flore. Si l'antibiotique continue à être absorbé, ces processus ne font que s'accroître par le mécanisme des sélections en chaîne, qui continue à provoquer l'appauvrissement de la flore (Brisou [2]).

a) *Modifications de la flore globale.* — Elles sont importantes et on observe soit une flore restant à prédominance Gram-négative, soit une flore devenant à prédominance Gram-positive, et cela quelle que soit la durée du traitement. La diminution de la flore Gram-négative est évidente sur les frottis et la flore Gram-positive est très augmentée par suite de la pullulation des staphylocoques et de l'apparition de nombreuses levures. Dans les cas où la flore reste à prédominance rouge, nous avons constaté que les espèces d'entérobactéries isolées se montraient résistantes *in vitro* à la tétracycline donnée.

Nous avons trouvé :

Chez 10 malades soumis à la terramycine, trois fois une flore à prédominance bleue ; chez 10 malades soumis à l'auréomycine, deux fois une flore à prédominance bleue, et chez 10 malades soumis à la sanclomycine, une fois une flore à prédominance bleue.

Voici deux exemples :

Marie Ser..., douze jours de tétracycline.

*Avant traitement* : Flore rouge très riche : bacilles Gram négatifs, 70 p. 100 ; bacilles Gram positifs, 20 p. 100 ; cocci (Entérocoques et Staphylocoques), 10 p. 100.

*Après traitement* : Flore rouge appauvrie : bacilles Gram négatifs, 60 p. 100 ; Cocci (Staphylocoques et rares Entérocoques), 40 p. 100.

Duph..., neuf jours de terramycine.

*Avant traitement* : Flore rouge prédominante, très riche : bacilles Gram négatifs, 60 p. 100 ; bacilles Gram positifs, 20 p. 100 ; Cocci, 20 p. 100 ; absence de levures.

*Après traitement* : Flore bleue prédominante : Cocci, 50 p. 100 ; bacilles Gram négatifs, 40 p. 100 ; nombreuses levures, 10 p. 100.

b) *Modifications de la coproculture.* — Nous avons observé une diminution importante d'*E. coli*, sans constater toutefois sa disparition complète. Avec la raréfaction extrême d'*E. coli*, on remarque la disparition d'*E. intermedium* (2 cas sur 10 après traitement par l'auréomycine et la terramycine et 1 cas sur 10 après traitement par la sanclomycine), la disparition des *paracoli* (3 cas sur 10 après traitement par la terramycine et 1 cas sur 10 après traitement par l'auréomycine et la sanclomycine), la dimi-

nution d'*A. aerogenes* (2 cas sur 10 après traitement par la terramycine et 1 cas sur 10 après traitement par l'auréomycine et la sanclomycine), et l'apparition de bacilles pyocyaniques (deux fois après traitement à la terramycine et une fois après traitement à l'auréomycine et à la sanclomycine).

Les modifications de la flore bleue sont également importantes : diminution des entérocoques, fréquente avec les trois antibiotiques, ou leur disparition dans 2 cas après traitement par la sanclomycine et dans un cas après traitement par la terramycine ; augmentation constante des staphylocoques dorés à critère pathogène (trois fois après traitement par la terramycine, deux fois après l'auréomycine et une fois après la sanclomycine).

Voici deux exemples :

Marie Ser, douze jours de tétracycline.

*Avant traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *P. vulgaris*, 2/10 ; *A. aerogenes*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques blancs, +.

*Après traitement* : *E. coli*, 4/10 ; *P. vulgaris*, 6/10 ; *A. aerogenes* rares, disparition des Entérocoques ; Staphylocoques dorés, + + +.

C. Ma..., douze jours de tétracycline.

*Avant traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *P. vulgaris*, 2/10 ; *P. intermedium*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques rares.

*Après traitement* : *E. coli*, 4/10 ; *P. vulgaris*, 6/10 ; disparition des *paracoli* et des Entérocoques ; Staphylocoques dorés, + + + et quelques colonies de *P. aeruginosa*.

Ce groupe d'antibiotiques a une action très marquée sur la flore intestinale de l'enfant, surtout quand les entérobactéries de cette flore sont sensibles et, cela, quelle que soit la durée du traitement. On constate généralement une diminution importante d'*E. coli*, la disparition fréquente des autres coliformes et la pullulation des *Proteus* par suite du déséquilibre provoqué dans la flore globale. Les bacilles Gram-positifs et les entérocoques sont très touchés, alors que les staphylocoques, généralement résistants, prolifèrent, ainsi d'ailleurs que les levures.

C'est l'oxytétracycline qui a la plus forte action destructive sur la flore intestinale et, dans nos cas, c'est la tétracycline qui semble avoir provoqué le moins de bouleversements de cette flore.

5° ERYTHROMYCINE (10 cas). — Cet antibiotique provoque surtout des modifications de la flore bleue (Mathieu du Fossey [7]), car la flore rouge reste inchangée par suite de l'insensibilité des entérobactéries à cet antibiotique.

a) *Modifications de la flore globale*. — Après traitement, la flore ne présente pas d'appauvrissement et reste à prédominance



rouge, souvent à un pourcentage plus élevé, par suite de la diminution de la flore bleue dans laquelle les entérocoques et les staphylocoques ont souvent disparu.

Voici un exemple :

Dup..., douze jours d'érythromycine.

*Avant traitement* : Flore riche à prédominance rouge : bacilles Gram négatifs, 70 p. 100 ; bacilles Gram positifs, 10 p. 100 ; Cocci (Entérocoques et Staphylocoques), 20 p. 100.

*Après traitement* : Flore rouge prédominante, très riche, et appauvrissement de la flore bleue : bacilles Gram négatifs, 80 p. 100 ; bacilles Gram positifs rares ; Cocci (Staphylocoques), 10 p. 100 et levures, 10 p. 100.

b) *Modifications de la coproculture.* — Dans les 10 cas, on retrouve les mêmes entérobactéries avant et après traitement, et dans les mêmes rapports d'isolement, et on ne constate jamais la diminution des coliformes au profit d'un *Proteus*. Dans 9 cas, on constate une nette diminution des staphylocoques et dans un cas on a observé, paradoxalement, une augmentation des staphylocoques, ceux-ci étant résistants *in vitro* à l'antibiotique. Une seule fois est apparue une culture de *P. aeruginosa*.

Voici un exemple :

D. Hu..., cinq jours d'érythromycine.

*Avant traitement* : *E. coli*, 5/10 ; *P. escherichia*, 2/10 ; Providence, 2/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques dorés, + + +.

*Après traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *P. escherichia*, 2/10 ; Providence, 2/10 ; rares Entérocoques et disparition des Staphylocoques dorés.

6° NÉOMYCINE (6 cas). — Cet antibiotique est très actif sur la flore intestinale, comme l'ont montré les travaux de Poth [8] et les publications de Ravina [9] et de Francillon et coll. [5].

a) *Modifications de la flore globale.* — Elles sont très prononcées. Dans 5 cas sur 6, la flore rouge est devenue bleue et constituée par 9/10 de bacilles Gram positifs, 1/10 de cocci et de très rares bacilles Gram négatifs. Cette flore est extrêmement pauvre et les selles deviennent molles et désodorisées.

Voici un exemple :

Marceline Lag..., 20 mois. Quarante-huit heures de néomycine à 0,50 g par vingt-quatre heures.

*Avant traitement* : Flore rouge prédominante, très riche : bacilles Gram négatifs, 60 p. 100 ; bacilles Gram positifs, 30 p. 100 ; Cocci, 10 p. 100 ; quelques levures.

*Après traitement* : Flore bleue, très pauvre : bacilles Gram positifs, 90 p. 100 ; bacilles Gram négatifs et cocci, 10 p. 100 ; quelques levures.

b) *Modifications de la coproculture.* — Les coprocultures sont également très perturbées. Dans 4 cas sur 6, on ne trouve plus, après traitement, d'entérobactéries sur les milieux d'isolement. Dans un seul cas, le *Proteus* avait subsisté, mais sous forme de rares colonies, et, dans un autre, *E. coli* persistait seul.

Dans 5 cas sur 6, les entérocoques persistaient sous forme de rares colonies, dans un cas seulement on retrouve un staphylocoque et dans un cas la coproculture s'est montrée complètement négative après traitement.

Voici deux exemples :

M. Lag..., 20 mois. Quarante-huit heures de néomycine à 0,50 g par vingt-quatre heures.

*Avant traitement* : *E. coli*, 7/10 ; *E. intermedium*, 1/10 ; *A. aerogenes*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques, +.

*Après traitement* : Quelques colonies d'Entérocoques, disparition de tous les coliformes et apparition de quelques colonies de *Proteus* (germe résistant *in vitro*).

Claudette Gr..., 20 mois. Quarante-huit heures de néomycine à 0,50 g par vingt-quatre heures.

*Avant traitement* : *E. coli*, 6/10 ; *E. intermedium*, 2/10 ; *P. aerogenes*, 1/10 ; Entérocoques, +.

*Après traitement* : Disparition complète de tous les coliformes et très rares colonies d'entérocoques seulement.

## B. — ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES.

La plus fréquemment utilisée est l'association pénicilline + streptomycine, en particulier comme traitement préventif post-opératoire. A côté de cette association, dont nous rapportons 11 cas, nous n'avons étudié qu'un seul cas pour chacune des autres associations, plus rarement utilisées, et nous les rapportons sans aucun commentaire.

1° ASSOCIATION PÉNICILLINE + STREPTOMYCINE. — Ces traitements ont été de longueur variable (trois jours à un mois). C'est dans les traitements de courte durée (trois à six jours) que nous avons noté les modifications les plus importantes, car il semble que, dans les traitements de longue durée, la flore intestinale se repeuple à partir d'espèces résistantes.

a) *Modifications de la flore globale.* — Dans tous les cas, la flore est restée à prédominance rouge. Dans 5 cas sur 11, nous avons observé, dans la flore bleue, une diminution des bacilles Gram positifs et des cocci et, dans 2 cas, une augmentation du taux des staphylocoques aux dépens des entérocoques et des bacilles Gram négatifs.

b) *Modifications de la coproculture.* — Les modifications les plus importantes ont été observées dans les traitements de courte durée (trois jours), où l'on note la disparition, dans un cas, de *K. pneumoniae*, dans 2 cas d'un *paracoli* et dans un autre cas, d'*E. intermedium*. Dans les traitements plus longs, la flore est peu différente avec, cependant, la diminution d'*E. intermedium* et de *P. aerogenes* avec prolifération d'*A. aerogenes* dans 2 cas, augmentation d'un *Proteus* par rapport aux coliformes dans un cas, apparition de *P. aeruginosa* dans deux cas et augmentation des staphylocoques dorés et des levures dans deux cas. C'est après un traitement d'un mois que nous avons isolé, dans une coproculture, *S. typhi murium* qui se comportait, en l'absence de toute manifestation clinique chez l'enfant, comme un germe de sortie.

2° ASSOCIATION SPIRAMYCINE + ÉRYTHROMYCINE. — Dans ce seul cas la flore est restée à prédominance rouge avec diminution seulement des germes Gram positifs. On observait une forte réduction des entérocoques et la disparition des staphylocoques dans la coproculture.

3° ASSOCIATION PÉNICILLINE + STREPTOMYCINE + ÉRYTHROMYCINE. — Après traitement, la flore est restée à prédominance rouge avec diminution de la flore bleue. On notait, dans la coproculture, la disparition d'un *P. intermedium* et des staphylocoques.

4° ASSOCIATION ÉRYTHROMYCINE + CHLORAMPHÉNICOL. — Après traitement, la flore devient à prédominance bleue par suite de la prolifération d'un staphylocoque à critère pathogène, résistant aux deux antibiotiques. Dans la coproculture, on observait la disparition d'*E. intermedium* et des entérocoques.

5° ASSOCIATION PÉNICILLINE + STREPTOMYCINE + CHLORAMPHÉNICOL. — La flore reste inchangée après traitement et la coproculture montre seulement la disparition de *P. aerogenes* et de *P. escherichia*.

\*  
\* \*

De cette étude, on peut conclure que l'action de chaque antibiotique est différente sur la flore intestinale aérobie du nourrisson et du jeune enfant. Les antibiotiques polyvalents (streptomycine, chloramphénicol, tétracyclines) apportent de grandes modifications de la flore intestinale globale, alors que les autres antibiotiques ont une action spécifique sur la flore bleue (pénicilline et érythromycine), ou sur la flore rouge (néomycine).

On constate fréquemment, après les traitements par les antibio-



tiques polyvalents, l'apparition ou la pullulation de nombreuses levures du type *C. albicans*.

Un point important mérite d'être souligné : c'est l'apparition fréquente, après traitement par les antibiotiques, de staphylocoques à critère pathogène et de *P. aeruginosa*.

Tous les enfants suivis, ayant été traités soit à l'hôpital, soit dans une pouponnière, il faut sans doute faire une part à l'endémie staphylococcique, signalée par Estrade [4] et à l'endémie pyocyanique, observée par Durand [3], ces deux germes pouvant contaminer les enfants après quelque temps de séjour dans ces collectivités.

Dans l'apparition de ces deux germes, et en particulier du pyocyanique, il faut faire également intervenir la longue durée du traitement antibiotique chez des enfants à flore intestinale pauvre car, chez d'autres enfants séjournant dans les mêmes salles, mais n'ayant reçu que les traitements de très courte durée, on isole plus rarement *P. aeruginosa* et les staphylocoques à critère pathogène sont beaucoup moins nombreux dans leurs selles que dans celles d'enfants ayant eu de plus longs traitements par les mêmes antibiotiques.

#### SUMMARY.

The study of the aerobic intestinal bacteria in sucklings and small children after antibiotic treatment shows gross modifications in the coprocultures corresponding to each antibiotic used for treatment.

Penicillin does not touch the Gram-negatives bacteria and only slightly influences the Gram-positives.

Streptomycin provokes important modifications, but only after treatment of long duration, and consisting of a decrease of coliforms, eventually increase of *Proteus* and sometimes apparition of *Pyocyaneus* and *Staphylococcus aureus*.

Chloramphenicol behaves much like streptomycin, but its activity on coliforms is much stronger after long treatment.

Tetracyclins provoke a decrease of Gram-negatives, and the generally resistant positives become proliferous, stimulated by the bacterial disequilibrium thus created.

Erythromycin only touches the Gram-positives, whereas all coliforms rapidly disappear under Neomycin treatment, this antibiotic being very active on Gram-negatives; enterococci, generally resistant to Neomycin, are not influenced by this drug.

Streptomycin is much less active on intestinal bacteria when combined with Penicillin than when administered alone.

After treatment with polyvalent antibiotics, numerous yeasts

of the *Candida albicans* type are frequently to be found in the children's feces.

There have been no serious clinical accidents among the cases studied by the authors. Only a few benign diarrhoeas have been observed.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. d'AGATA. *J. A. M. A.*, 1954, **156**, n° 11.
- [2] J. BRISOU. *Presse médicale*, 1953, **61**, 748.
- [3] B. DURAND. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1954, n° 267.
- [4] G. ESTRADÉ. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1954, n° 94.
- [5] J. FRANCILLON, L. GENEST et J. PELLERAT. *Lyon chir.*, 1955, **50**, 582.
- [6] P. LE NÔC. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1955, n° 227.
- [7] B. MATHIEU DU FOSSEY. *Presse médicale*, 1953, **61**, 687.
- [8] E. J. POTH. *The Amer. Surg.*, 1952, **18**, 572.
- [9] R. RAVINA. *Presse médicale*, 1953, **61**, 406.

**CONTRIBUTION**  
**A L'ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE BACTÉRIENNE**  
**VIRULENCE ET ÉQUIPEMENT ENZYMATIQUE DES MYCOBACTÉRIES**

par Jean DESBORDES, Étienne FOURNIER, E. ROSENBERG  
et Denise ALIX (\*) (\*\*)  
(avec l'aide de M<sup>me</sup> GAUTIER, aide-technique à l'I. N. H.)

(*Centre hospitalier Emile-Roux [Service du D<sup>r</sup> JEAN PARAF]*  
*et Institut National d'Hygiène (professeur BUGNARD)]*)

Diverses recherches ont révélé récemment [41, 7] que l'acquisition de la propriété de résistance de certaines Mycobactéries pathogènes vis-à-vis des antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique antituberculeuse s'accompagnait de modifications profondes dans l'équipement enzymatique. En particulier, les travaux ont été nombreux en ce qui concerne la baisse des variations du pouvoir catalasique vis-à-vis de l'acquisition de la résistance à l'INH.

Par ailleurs, on a parfois soutenu que ces bacilles tuberculeux, qui avaient acquis la résistance à l'INH, étaient moins pathogènes dans leurs manifestations virulentes vis-à-vis des animaux d'expérience que les souches dont ils provenaient.

Les premiers travaux de Middlebrook [41] confirmés par de nombreuses publications, où parmi une littérature extraordinairement abondante on peut retenir les noms de Daddi [6], Conalty [5], Gernez-Rieux [7], Meissner [10], Patnode [12], Bonicke [3], etc., tendent à montrer que les germes devenus résistants à l'INH et qui sont catalase —, sont moins pathogènes pour le cobaye en particulier.

Par contre, d'autres auteurs semblent contredire ces résultats (Bloch, Katz [9], Hermann [8], etc.), Bolch, Widelock et Peizer [4] sont particulièrement affirmatifs et déclarent n'avoir jamais constaté de corrélation entre la sensibilité à l'INH et la virulence. En réalité, à la lecture de divers articles, on a l'impression que l'hypothèse de l'existence d'un mélange de germes, ou celle de

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 février 1956.

(\*\*) Ce travail a été réalisé avec l'aide de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale

l'inconstance de la conservation de ces caractères chez certains germes (soutenue par certains chercheurs) repose sur des arguments de poids (Meissner [10], Gernez-Rieux [7], Zebrowski [14], Cohn [3], Peizer [13], etc.).

En particulier, Cohn et Middlebrook [4] notent que de simples variations de certains constituants du milieu de culture influencent l'incidence des mutants résistants à l'INH. Ces auteurs estiment que l'on peut identifier au moins trois types de mutants résistants pouvant être obtenus à partir de souches INH sensibles et virulentes.

Deux de ces mutants voient baisser considérablement leur pouvoir catalasique, mais le troisième garde une activité nette. Ces trois types n'apparaissent qu'en nombre restreint et dans des milieux renfermant de faibles concentrations d'INH. De plus, les auteurs estiment que le nombre des mutants résistants peut varier suivant la souche initiale de B. K.

Peizer et ses collaborateurs (Widelock, Peizer, etc.) ont même publié, dans des articles successifs, des résultats contradictoires. Cette divergence est peut-être due aux modes différents d'isolement et de culture de B. K. avant leur inoculation. Souvent les différents auteurs n'emploient pas les mêmes techniques.

C'est pourquoi nous avons repris cette étude en examinant les résultats des inoculations au *cobaye* de germes isolés à partir d'expectorations de malades examinés au Centre hospitalier Emile-Roux, les uns catalase +, les autres catalase —.

#### TECHNIQUE.

Après isolement des germes à partir du matériel pathologique précisé ci-dessus, on vérifie le comportement vis-à-vis de trois antibiotiques : streptomycine, PAS, INH, et on titre leur activité catalasique selon une double méthode.

La *méthode microscopique* utilise l'eau oxygénée à un volume. La manipulation très simple, consiste à placer sur une lame une anse de platine de Mycobactéries prélevées sur milieu solide. On ajoute entre lame et lamelle II à III gouttes d' $H_2O_2$ . Au bout de soixante secondes l'examen au faible grossissement montre un dégagement gazeux abondant, envahissant toute la préparation quand le germe a une activité catalasique.

La *méthode volumétrique*, plus précise, nécessite un appareil de Warburg à température ordinaire. Les germes (une anse de platine) sont placés dans la fiole de Warburg (zone périphérique) et, après mise en équilibre thermique, on ajoute 1 cm<sup>3</sup> d' $H_2O_2$  à 1 p. 100. La réaction est très rapide et peut être lue au bout de deux à quatre minutes.

Si un dégagement gazeux se produit (bulle dans le premier cas,



variation manométrique dans le deuxième cas), le germe est considéré catalase +, sinon il est catalase —.

Les germes sont toujours inoculés à deux cobayes de 350 g, suivant des doses variables : doses faibles, doses fortes. Le tableau I résume quelques résultats obtenus. Quatre clichés de résultats de catalases positives et cinq clichés de résultats de catalases négatives complètent ces données.

### RÉSULTATS.

Nos résultats d'inoculation au cobaye nous ont assez surpris, en nous montrant la relative rareté des résultats habituels avant l'ère des antibiotiques. Alors que, *classiquement*, *Mycobacterium hominis* tue régulièrement le cobaye en quelques semaines et que les lésions tuberculeuses sont toujours énormes en moins de deux mois, l'inoculation des mélanges de germes isolés de nos malades chroniques n'a provoqué des phénomènes identiques qu'une fois sur 4 ou 5 environ.

TABLEAU I. — Résultats des expériences faites sur les cobayes sacrifiés entre cent vingt et cent soixante jours.

	Témoin	cob. n°1	cob. n°2	cob. n°3	cob. n°4	cob. n°5	cob. n°6	cob. n°7	cob. n°8	cob. n°9	cob. n°10
catalase (test)		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Dose inoculée		Fte	Fte	Fble	Fble	Fte	Fte	Fte	Fble	Fble	Fble
Point inoc. (ganglion)	énorme	petit caséum	petit	petit caséum	assez gros	gros	gros	gros caséum	gros caséum	caséum	caséum
Foie	+++	0	0	+	0	+	+	0	0	0	+
Rate	+++	0	0	0	0	++	+	+	+	+	+
Poumons	+++	+	0		0	+	0	0	0	+	0

Dose forte : 1 mg. Dose faible : 1/10 mg.

En ce qui concerne la comparaison entre les germes catalase + et catalase —, voici ce que nous pouvons observer :

1° Les inoculations avec les germes catalase + déterminent une tuberculose ganglionnaire volumineuse (de la taille d'une cerise ou d'un marron) au voisinage du point d'inoculation, mais la dissémination *secondaire* s'est montrée le plus souvent *inconstante*, souvent limitée, au bout de deux mois, à des nodules tuberculeux pulmonaires et hépatiques.



FIG. 1. — Cobaye n° 17. Malade P... Catalase positive. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein imprégné de 2  $\mu$ g de streptomycine. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : gros ganglion caséux (marron cru) ; rate normale ; poumons normaux ; foie normal. Ci-dessus : ganglion et rate.

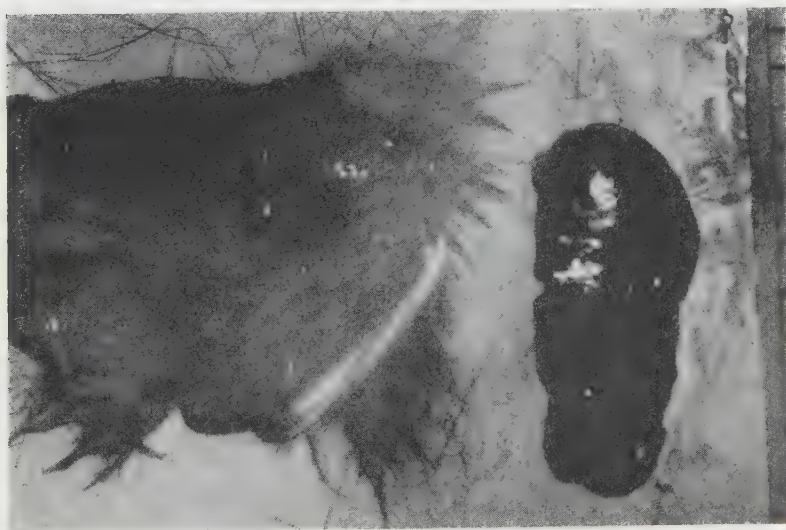


FIG. 2. — Cobaye n° 23. Malade P... Catalase positive. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein. Tube témoin. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : ganglions caséux ; rate normale ; poumons normaux ; foie normal. Ci-dessus : ganglion et rate.



FIG. 3. — Cobaye n° 24. Malade P... Catalase positive. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein imprégné de 10  $\mu$ g de streptomycine. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : ci-dessus : ganglions moyens caséux ; rate normale ; foie normal.

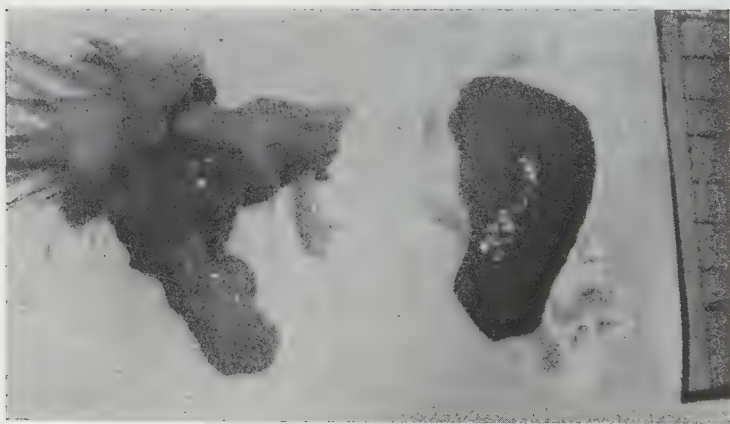


FIG. 4. — Cobaye n° 27. Malade P... Catalase positive. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein. Tube témoin. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : ganglions caséux ; rate normale ; poumons normaux ; foie normal. Ci-dessus : rate et ganglions.



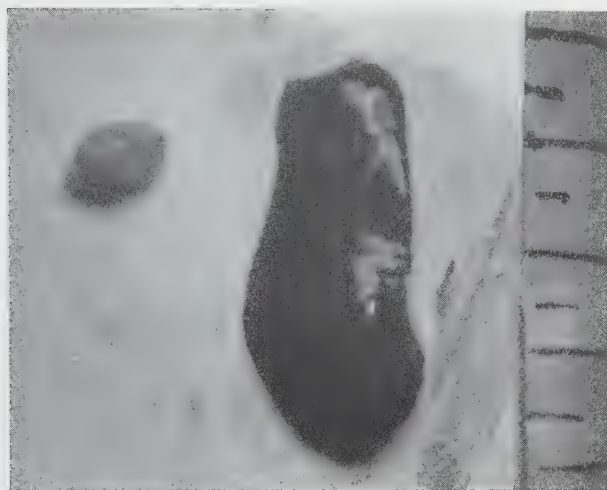


FIG. 5. — Cobaye n° 22. Malade P... Catalase négative. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein imprégné de 5  $\mu$ g d'INH. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : rate normale ; foie normal ; poumons, quelques granulations. Ci-dessus : rate et ganglion normal.

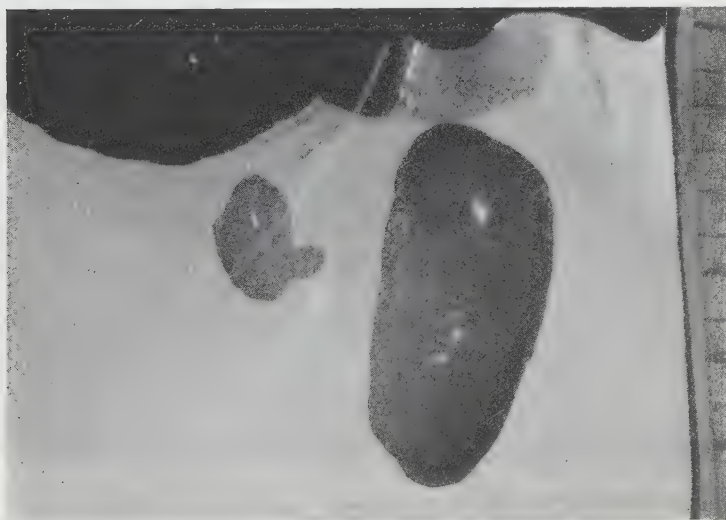


FIG. 6. — Cobaye n° 18. Malade P... Catalase négative. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein imprégné de 5  $\mu$ g d'INH. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : petit ganglion caséux ; rate normale ; foie, quelques granulations. Ci-dessus : ganglion et rate.



FIG. 7. — Cobaye n° 18. Malade P... Catalase négative. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein imprégné de 5  $\mu$ g d'INH. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : petit ganglion caséux ; rate normale ; foie, quelques granulations. Ci-dessus : foie.

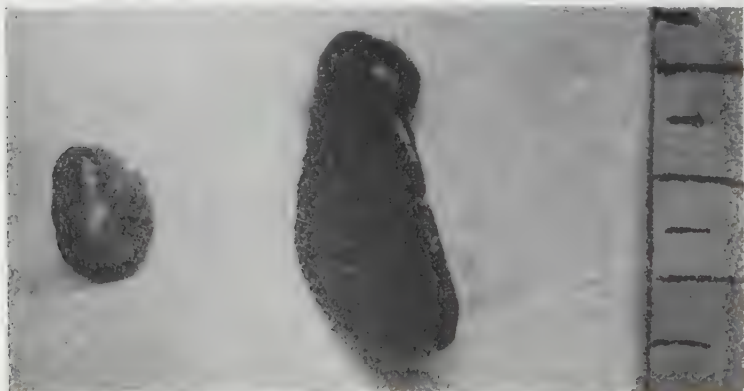


FIG. 8. — Cobaye n° 25. Malade L... Catalase négative. B. K. prélevé sur milieu de Löwenstein. Tube témoin. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : petit ganglion ; rate normale ; foie normal ; poumons normaux. Ci-dessus : rate et ganglion.

La dose bacillaire à l'inoculation joue naturellement un rôle important dans l'évolution et la diffusion des lésions. *Les inoculats importants conduisent à des lésions plus importantes que les faibles.*

2° Avec les bacilles catalase — le rôle de la dose d'inoculation paraît moindre. Dans tous les cas, le ganglion d'inoculation reste le plus souvent petit, les généralisations sont rares et toujours discrètes.

Un de nos résultats est intéressant à commenter. Il s'agit de

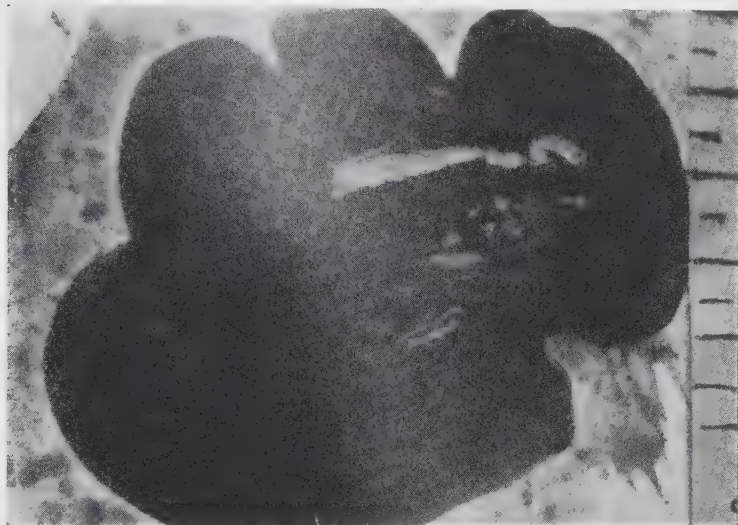


FIG. 9. — Cobaye n° 25. Malade L... Catalase négative. B. K. prélevé sur milieu de Löwnstein. Tube témoin. Dose inoculée : 1 mg.

L'autopsie révèle après deux mois : petit ganglion ; rate normale ; foie normal ; poumons normaux. Ci-dessus : foie.

l'inoculation de deux types bacillaires isolés chez un *même malade* traité depuis trois ans, et dissociés par la culture sur antibiotique en deux types : l'un catalase +, l'autre catalase —. Les germes catalase + ont provoqué la formation de volumineux ganglions au point d'inoculation, mais sans *généralisation secondaire*. Les germes catalase — ont déterminé des lésions minimales au point d'inoculation, et l'on a retrouvé un petit ganglion inconstant. Mais sur les deux cobayes nous avons trouvé à l'autopsie des granulations peu nombreuses sur le foie et la rate.

On a donc l'impression que la perte d'activité catalasique s'accompagne schématiquement d'une diminution du pouvoir



pathogène. Cependant il existe des interprétations délicates, car il nous semble que des germes *cultivés sur Loewenstein* gardent très souvent un pouvoir pathogène appréciable, même en ayant perdu toute activité catalasique. Inversement, certains germes actuellement *isolés* de tuberculeux chroniques ayant subi un long traitement par antibiotiques et catalase + semblent avoir perdu une partie de leur aptitude pathogène.

Il semble donc bien exact que, en ce qui concerne l'aptitude pathogène sur le cobaye, le comportement des germes ayant subi un long contact avec un antibiotique, soit modifié par rapport à l'action des témoins.

Ces modifications sont-elles irrémédiablement liées à l'activité catalasique ? Il semble que des recherches complémentaires soient nécessaires, ce à quoi nous nous employons.

#### SUMMARY.

Recent investigations have shown the relation existing between resistance against antibiotics and loss of certain enzymatic activities in pathogenic *Mycobacteria*.

The authors' experiments show the decrease of pathogenicity in *Mycobacteria* isolated from tuberculous material and having lost their catalase activity. This loss of virulence however is incomplete and irregular.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. BLOCH et coll. *Amer. Rev. Tub.*, 1953, **68**, 738.
- [2] C. R. BONICKE. *Naturwiss.*, 1954, **41**, 430.
- [3] M. L. COHN et coll. *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 465.
- [4] M. L. COHN et coll. [G. MIDDLEBROOK]. *Am. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 641.
- [5] M. L. CONALTY et E. E. GAFFNEY. *Amer. Rev. Tub.*, 1955, **71**, 799.
- [6] G. DADDI. *Not. Ist. Vaccin. Antitub. Ital.*, 1955, **5**, 8.
- [7] C. GERNEZ-RIEUX, A. TACQUET, G. VOISIN et M. FABRE. *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 1.
- [8] W. HERMANN et F. W. GIERHAKE. *Beitr. klin. Tub.*, 1955, **113**, 265.
- [9] S. KATZ, P. B. STOREY et G. F. MAC CORMICK. *Am. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 881.
- [10] G. MEISSNER. *Beitr. klin. Tub.*, 1955, **113**, 280.
- [11] G. MIDDLEBROOK et M. L. COHN. *Science*, 1953, **118**, 297.
- [12] R. A. PATNODE et coll. *Amer. J. publ. Hlth*, 1955, **45**, 451.
- [13] C. R. PEIZER, A. MINKIN et D. WIDELock. *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 728.
- [14] T. ZEBROWSKI et coll. *Beitr. klin. Tub.*, 1955, **113**, 269.

**INVALIDITÉ DE LA DISTINCTION  
ENTRE  
SALMONELLA GALLINARUM ET SALMONELLA PULLORUM  
ET DE  
LEURS « VARIANTES » BIOCHIMIQUES ENTRE ELLES**

par P. GORET, L. JOUBERT et J. OUDAR (\*) (\*\*).

(Ecole Vétérinaire de Lyon, Laboratoire de Bactériologie)

Sous le terme générique de « typhose aviaire », on enferme généralement deux maladies apparemment distinctes dans leurs caractéristiques épidémiologiques, cliniques et étiologiques :

La typhose proprement dite, maladie chronique des reproducteurs adultes, due à *Salmonella gallinarum* ;

La pullorose, maladie septicémique de l'embryon prêt à éclore ou du poussin, due à *Salmonella pullorum*.

A l'instigation des travaux de F. Kauffmann [1], la distinction bactériologique entre *S. gallinarum* et *S. pullorum* s'opérait grâce à l'interrogatoire d'un certain nombre de tests, dont suit le résumé synoptique (tableau I).

En revanche, le test sérologique de l'agglutination désignait comme *seule espèce antigénique* : *S. gallinarum* I, IX, XII (groupe D). Tout au plus, la présence ou l'absence d'un antigène XII<sub>2</sub> permettait-elle de séparer sérologiquement certaines souches, sans qu'aucun parallélisme puisse s'établir entre la présence de cet antigène accessoire et celle des caractéristiques de *S. gallinarum* ou *S. pullorum*.

Le caractère arbitraire de ce schéma classique devait être dénoncé par Kauffmann lui-même, dont le dernier traité sur les Entérobactéries [1] supprime explicitement toute possibilité de distinction entre les deux germes. Pour lui, le germe désormais désigné sous le vocable « *Salmonella gallinarum-pullorum* »,

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 février 1956.

(\*\*) Les détails de cette note, ainsi que la bibliographie afférente sont contenus dans le travail de l'un de nous : J. Oudar. « Invalidité de la distinction épidémiologique, clinique et bactériologique entre *Salmonella gallinarum* et *Salmonella pullorum* ». Thèse Doct. Vétér. Lyon, 1956.

TABLEAU I.

	Dimension des colonies sur gélose ordinaire	Petit lait tournesolé	Dul- cite	Production de gaz à l'attaque du glucose	Amidon (milieu de Truche)	Déga- gement de H <sub>2</sub> S	D-Tar- trate de Soude.
<u>Salmonella</u> <u>gallinarum</u>	Grande taille (en moyenne 1 à 2mm)	-	+	-	+	-	+
<u>Salmonella</u> <u>pullorum</u>	Petite taille (inférieure à 1 mm)	+	-	+	-	+	-

admet des « types biochimiques » qui doivent rester innominés et s'ordonner selon le schéma suivant :

Adonitol . . .	—	Dulcitol . . . . .	v
Xylose . . .	v	Rhamnose . . . . .	v
Inositol . . .	—	Lactose . . . . .	—
Glucose . . .	++ ou +—	Indole . . . . .	—
Gélatine . . .	—	Ammonium-glucose . .	v
L-tartrate . .	v	i-tartrate . . . . .	—
Sorbitol . . . . .	v	Arabinose . . . . .	+
Maltose . . . . .	v	Salicine . . . . .	—
Sucrose . . . . .	—	Mannitol . . . . .	++ ou +—
Stern . . . . .	—	H <sub>2</sub> S . . . . .	v
Ammonium-citrate . . .	—	D-tartrate . . . . .	v
Sodium-citrate . . . . .	v	Mucate . . . . .	v

— négatif, v = variable, + positif, ++ acide et gaz, +— acide sans gaz.

Après Delpy et Rastegar [2], Lucas et ses collaborateurs [3], R. Néel, L. Le Minor et Hussein-Taslimi [4], Schoenaers [5] et ses collaborateurs signalaient l'instabilité des caractères biochimiques de *S. gallinarum* qui devait donc être considérée comme espèce unique, non différenciable en *S. gallinarum* et *S. pullorum*. Enfin, l'existence de souches de *S. gallinarum* intermédiaires entre les deux types extrêmes selon des nuances extrêmement diverses (en particulier *S. Duisburg*) devait être reconnue par de nombreux auteurs.

Une première conclusion semble donc s'imposer à l'heure actuelle : *il existe une Salmonella gallinarum, espèce sérologique répandant à une formule sérologique bien établie, mais se subdivisant en une poussière de variétés biochimiques innommées et inclassables en raison de la non-fixité de leurs caractères.*

Or, le désir légitime de faciliter les enquêtes épidémiologiques et de retrouver le cheminement des contagions a incité certains auteurs à classer les variétés biochimiques de *S. gallinarum* en un nombre restreint de « variantes » (1) biochimiques, remettant

(1) Sur le plan de la terminologie pure, nous nous élevons contre ce terme de « variante », en général réservé à la désignation de variétés immunologiques au sein d'un type (Cf. les types et les variantes du virus aphteux).

en question la validité de la distinction bactériologique entre *S. gallinarum* et *S. pullorum* et de leurs variétés biochimiques entre elles.

Au surplus, les caractères lysotypiques et l'antibiosensibilité des souches de *S. gallinarum* pouvaient apporter de précieux renseignements.

Enfin, la considération de l'allure épidémiologique et de l'aspect clinique des enzooties aviaires dues à *S. gallinarum*, trop souvent méconnue, méritait d'être étudiée concurremment.

C'est pourquoi depuis trois ans (1953, 1954, 1955) 48 enzooties aviaires dues à *S. gallinarum* ont été simultanément considérées sous leurs aspects :

*Epidémiologique*, avec référence spéciale à la répartition géographique et aux caractères de la contagion ;

*Clinique*, en observant les maladies chroniques ou septicémiques chez le poussin ou l'adulte (2) ;

*Bactériologique* et principalement *biochimique* grâce aux tests exposés ci-dessus, et *pathogène* (inoculation à la souris avec recherche de la  $DL_{50}$ ) ;

*Sérologique*, par la recherche de l'antigène XII<sub>2</sub> (3) ;

*Lysotypique*, en tentant d'isoler les souches de phages spécifiques et d'en déduire une classification lysotypique (4) ;

*Thérapeutique*, grâce au test d'antibiosensibilité rapide.

Arbitrairement, nous désignerons dans cette étude par les termes de *S. gallinarum* et *S. pullorum*, des bactéries qui semblent entrer dans le schéma initial de Kauffmann, en accordant la préférence au test de la dulcité pour les séparer.

## I. — DISTINCTION ÉPIDÉMIOLOGIQUE.

A. RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE. — L'étude de la répartition géographique des souches isolées dans de nombreux départements français semble prouver qu'il n'existe pas de région ou de province de prédilection pour l'un ou l'autre type de *Salmonella* (Cf. tableau III).

(2) Nos remerciements vont aux vétérinaires praticiens qui nous ont confié le diagnostic bactériologique des salmonelloses aviaires décelées dans leurs clientèles.

(3) Nous tenons à remercier M. le Dr Le Minor, de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu mettre à notre disposition les sérums spécifiques nécessaires.

(4) Cette étude a pu être poursuivie grâce à l'extrême obligeance de M. le Dr P. Nicolle, de l'Institut Pasteur, à qui nous exprimons notre vive reconnaissance.



B. ESPÈCES AFFECTÉES. — a) La considération des espèces affectées nous a apporté la preuve que *S. gallinarum*, le plus souvent rencontrée chez la poule, trouvait très réceptives les autres espèces de basse-cour (pintade, dindon et canard), ainsi que les mammifères (enzootie chez le rat albinos de laboratoire à *S. gallinarum*). Inversement, dans certaines enzooties de salmonelloses aviaires, ont été reconnus des germes autres que *S. gallinarum* (*S. typhi murium*, *S. cholerae suis*). Ainsi, fait commun et classique dans le monde des salmonelles, *S. gallinarum* (espèce sérologique) est loin de se prévaloir d'une spécificité stricte d'espèce puisque :

*S. gallinarum* ou *S. pullorum* peuvent déterminer des infections chez d'autres espèces que la poule (oiseaux et mammifères) ;

*S. gallinarum* ou *S. pullorum* peuvent être absentes d'une enzootie salmonellique, chez la poule, enzootie due en revanche à d'autres *Salmonellae*.

b) L'isolement, simultanément, du cerveau d'un même poussin, mort de salmonellose typique avec lésions classiques, de *S. gallinarum* d'une part et de *S. pullorum* d'autre part, constitue un commencement de preuve, pour le moins, que *S. gallinarum* (espèce sérologique) ne saurait même pas se réclamer d'une spécificité d'individu. Cette coexistence des deux germes chez un même individu pose par surcroît un certain nombre de problèmes de bactériologie pure sur la transformation de *S. gallinarum* en *S. pullorum* et vice versa. En particulier, il est naturel d'évoquer ici la transmutation réciproque possible des types humain et bovin de bacilles tuberculeux et l'apparition des formes G (goniviales ou naines) des *Salmonellae*.

c) *Age des individus infectés* : Enfin, l'étude statistique de la répartition de *S. gallinarum* et *S. pullorum* parmi les sujets jeunes (poussins) et adultes (reproducteurs) a fourni les résultats suivants :

Chez le poussin, où l'on devrait en principe isoler surtout *S. pullorum*, 60 p. 100 seulement des souches ont été arbitrairement classées *S. pullorum* et 40 p. 100 *S. gallinarum*.

Chez l'adulte, inversement, où l'on s'attend naturellement à isoler surtout *S. gallinarum*, 65 p. 100 seulement des souches ont été reconnues appartenir au type *S. gallinarum* et 35 p. 100 à *S. pullorum*.

La double équation simpliste : poussin = *S. pullorum* et adulte = *S. gallinarum*, se vérifie donc dans plus de la moitié des cas, mais devient erronée dans un pourcentage de diagnostics tel qu'on y voit la condamnation du schéma de principe qui faisait de *S. pullorum* le parasite presque électif du poussin et de *S. gallinarum* celui de l'adulte.

## II. — DISTINCTION CLINIQUE.

L'observation de typhose aviaire aiguë chez l'adulte, tant à *S. gallinarum* qu'à *S. pullorum*, celle de pullorose chronique chez le poussin à partir de deux semaines, tant à *S. gallinarum* qu'à *S. pullorum*, infirment là encore la double équation qui posait :

Adulte = typhose chronique surtout à *S. gallinarum* et

Poussin = pullorose aiguë surtout à *S. pullorum*.

Certes, toute loi biologique admet des exceptions nombreuses, mais le pourcentage de ces exceptions paraît, en ce domaine, à ce point élevé qu'il infirme la loi (Cf. tableau III).

## III. — DISTINCTION BACTÉRIOLOGIQUE.

Nous envisagerons successivement (Cf. tableau III) :

La *morphologie des colonies* et les *caractères biochimiques fondamentaux* interrogés pour séparer *S. gallinarum* et *S. pullorum* ;

Les *caractères biochimiques* accessoires destinés à classer les diverses variétés biochimiques des deux germes ;

Les *caractères pathogènes* sur souris et sur oiseaux.

A. MORPHOLOGIE DES COLONIES ET CARACTÈRES BIOCHIMIQUES FONDAMENTAUX. — Les souches isolées ont été à deux reprises successives, dès l'isolement, puis six mois plus tard (conservation par cryodessiccation ou repiquages), examinées selon les tests proposés naguère par Kauffmann pour séparer *S. gallinarum* et *S. pullorum*.

Il en ressort :

1° DIMENSION DES COLONIES SUR GÉLOSE ORDINAIRE : 13 souches, soit 24 p. 100, se développent avec des colonies de grande taille et peuvent donc être considérées comme *S. gallinarum*.

35 souches, soit 76 p. 100, forment des colonies de petite taille et paraissent en première analyse appartenir au type *S. pullorum*.

2° PETIT LAIT TOURNESOLÉ : 17 souches (35 p. 100) n'entraînent aucun virage, telle *S. gallinarum* classique.

23 souches (48 p. 100) acidifient le milieu, telle *S. pullorum* classique.

8 souches (17 p. 100) donnent lieu au caméléonage du milieu (acidification puis réalcalinisation) et ne peuvent qu'arbitrairement être classées dans l'un ou l'autre type.

3° DULCITE (milieu semi-solide mobilité-dulcité et milieu liquide à 10 p. 100 de dulcité) :

a) *Examen à l'isolement* : 20 souches (43 p. 100) attaquent la dulcité (en principe *S. gallinarum*) ;

28 souches (57 p. 100) n'attaquent pas le sucre (en principe *S. pullorum*).

b) *Examen après six mois* : 14 p. 100 des souches s'étaient modifiées dans les deux sens. L'éventualité d'une souillure doit être écartée, toutes les précautions ayant été prises pour affirmer la pureté des souches.

4° PRODUCTION DE GAZ A L'ATTAQUE DU GLUCOSE : Nous n'avons pas retenu cette rubrique en raison de la variabilité des résultats obtenus.

5° AMIDON (milieu de Truche) : 21 souches (44 p. 100) attaquent l'amidon et font virer le milieu au vert ou au jaune (en principe *S. gallinarum*).

27 souches (56 p. 100) n'attaquent pas l'amidon et font virer le milieu au bleu (en principe *S. pullorum*).

6° DÉGAGEMENT DE  $H_2S$  (milieu de Hajna et gélose au sous-acétate de plomb) : 30 souches (62 p. 100) ne dégagent pas  $H_2S$  (en principe *S. gallinarum*).

18 souches (37 p. 100) libèrent  $H_2S$  (en principe *S. pullorum*).

7° D-TARTRATE DE SOUDE : 26 souches (54 p. 100) utilisent le D-tartrate (en principe *S. gallinarum*).

22 souches (40 p. 100) ne l'utilisent pas (en principe *S. pullorum*).

Il est clair, d'après cette étude :

1° Que la concordance des différents tests (morphologie des colonies, petit lait tournesolé, dulcité, amidon, dégagement de  $H_2S$  et D-tartrate de soude) est rare, exactement neuf fois (2 souches de *S. gallinarum* et 7 de *S. pullorum*) sur quarante-huit, soit environ une fois sur cinq. Ainsi, quatre fois sur cinq, l'un au moins des tests n'est pas conforme au schéma proposé, résultat qui doit faire rejeter ce schéma pour différencier *S. gallinarum* de *S. pullorum* et qui incite à nier la possibilité de séparer les deux types de salmonelles grâce à la coïncidence d'un faisceau de preuves suffisant.

2° Que, au moins pour la dulcité, la variabilité de l'action enzymatique de certaines souches souligne la contingence de tout test basé sur l'appréciation des caractères biochimiques du germe.

B. CARACTÈRES BIOCHIMIQUES ACCESSOIRES. VARIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — L'attaque par *S. gallinarum* et *S. pullorum* de nom-

breux hydrates de carbone avait été étudiée par nombre de chercheurs, dans le but de préciser l'équipement enzymatique glucidique de ce genre de bactéries et surtout de faciliter les enquêtes épidémiologiques portant sur la contagion de la typhose aviaire d'élevage à élevage. Récemment, Lucas et ses collaborateurs [3] apportaient des précisions supplémentaires concernant l'attaque des hydrates de carbone par 155 souches françaises et 6 souches américaines de *S. pullorum* et par 66 souches françaises de *S. gallinarum*, et réussissaient à les intégrer dans une classification relativement simple et rationnelle (4 variétés de *S. pullorum* séparées par les caractères de fermentation du maltose, du xylose, du rhamnose et du mannose, 3 variétés de *S. gallinarum* séparées par les caractères de fermentation du maltose et du xylose seulement).

Le pouvoir fermentaire de nos souches a été étudié sur 19 hydrates de carbone :

Xylose, arabinose, glucose, galactose, lévulose, saccharose, lactose, glycérine, rhamnose, mannite, dulcité, dextrine, maltose, inuline, mannose, sorbite, inosite, raffinose, tréhalose.

La concentration de ces substances dans le milieu de culture (eau peptonée à 4 p. 100 additionnée de rouge de phénol) a été de 1 p. 100. La lecture s'est effectuée chacun des dix jours ayant suivi l'ensemencement.

Des divergences fermentaires sont apparues dans l'attaque de 7 hydrates de carbone seulement :

Xylose, rhamnose, maltose, mannose, dextrine, inuline, sorbite, seuls capables, par conséquent, de servir de base à une éventuelle classification biochimique de ces germes.

Les diverses variétés biochimiques de *S. gallinarum* admettent d'être rangées dans 7 groupes distincts (5) :

<b>Groupe 1 :</b>	Xylose . . . . + (1 jour)	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . . —	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . + (1 jour)	Sorbité . . . . —
	Mannose . . . . +	
<b>Groupe 2 :</b>	Xylose . . . . + (1 jour)	Dextrine . . . . + (1 jour)
	Rhamnose . . . + (4 jours)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . + (1 jour)	Sorbité . . . . —
	Mannose . . . . + (1 jour)	
<b>Groupe 3 :</b>	Xylose . . . . + (1 jour)	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . . + (1 jour)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . + (1 jour)	Sorbité . . . . —
	Mannose . . . . + (1 jour)	

(5) Après confrontation, il est facile d'établir un tableau de concordance de la classification proposée par A. Lucas et coll. et de celle avancée par nous :

Groupe 1 = type A de Lucas ; groupe 5 = type B de Lucas ; groupe 6 = type C de Lucas.



<i>Groupe 4 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . + (1 jour)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . + (4 jours)
	Mannose . . . . + (1 jour)	
<i>Groupe 5 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . + (1 jour)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . + (1 jour)	Sorbite . . . . + (4 jours)
	Mannose . . . . + (1 jour)	
<i>Groupe 6 :</i>	Xylose . . . . +	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . +	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . + (9 jours)
	Mannose . . . . +	
<i>Groupe 7 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . +
	Rhamnose . . + (3 jours)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . +	Sorbite . . . . +
	Mannose . . . . +	

Les diverses variétés biochimiques de *S. pullorum* se réclament de 9 groupes différents (6) :

<i>Groupe 1 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . —	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . —
	Mannose . . . + (1 jour)	
<i>Groupe 2 :</i>	Xylose . . . . + (1 jour)	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . —	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . —
	Mannose . . . + (1 jour)	
<i>Groupe 3 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . + (1 jour)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . + (7 jours)
	Mannose . . . + (1 à 2 jours)	
<i>Groupe 4 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . —	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . + (4 jours)
	Mannose . . . . —	
<i>Groupe 5 :</i>	Xylose . . . . + (1 jour)	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . + (1 jour)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . —
	Mannose . . . . +	
<i>Groupe 6 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . + (4 jours)	Inuline . . . . —
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . —
	Mannose . . . + (1 jour)	
<i>Groupe 7 :</i>	Xylose . . . . —	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . + (3 jours)	Inuline . . . . + (1 jour)
	Maltose . . . . —	Sorbite . . . . —
	Mannose . . . + (1 jour)	
<i>Groupe 8 :</i>	Xylose . . . . + (1 jour)	Dextrine . . . . —
	Rhamnose . . + (1 jour)	Sorbite . . . . —
	Mannose . . . + (1 jour)	

(6) De la confrontation de cette classification avec celle de A. Lucas et coll. se déduit le tableau de correspondance suivant : Groupe 1 = type 2 de Lucas ; groupe 3 = type 3 de Lucas ; groupe 5 = type 1 de Lucas.

Groupe 9 : Xylose . . . .	—	Dextrine . . . .	+
Rhamnose . . . .	—	Iouline. . . .	—
Maltose. . . .	+	Sorbite . . . .	—
Mannose . . . .	+		

Certaines de ces substances ont été attaquées différemment après six mois de conservation par cryodessiccation et repiquages en série.

TABLEAU II.

Filtrats	3I	32	34	36	37	4I	45	46
Souches sensibles								
2	0	0	0	0	0	0	5A	3A
3	3A	0	0	0	0	0	7A	IA
5	5A	0	0	0	0	0	2A	0
7	IA	0	0	0	0	0	2A	0
8	0	0	0	0	0	0	IA	0
9	4A	IA	0	0	0	0	4A	2A
10	0	0	0	0	0	0	IA	IA
11	2A	0	0	0	0	0	IA	IA
12	3A	0	0	0	0	0	IA	IA
14	0	0	0	0	0	0	2A	0
16	0	0	0	0	0	6A	IA	IA
19	0	0	0	0	0	0	2A	IA
20	0	0	0	IA	0	0	4A	0
21	IA	0	0	0	0	0	0	0
27	IA	0	0	0	0	0	0	IA
29	4A	0	0	0	0	0	3A	0
33	0	0	0	0	0	0	IA	0
42	IA	0	0	0	0	0	IA	0
44	0	0	0	0	0	0	3A	2A
48	IA	0	0	0	0	0	2A	0
50	4A	0	IA	0	0	0	2A	0
53	2A	0	0	0	0	0	IA	IA
54	2A	0	0	IA	IA	0	IA	IA
57	IA	0	0	0	0	0	IA	0
60	3A	0	0	IA	IA	0	IA	3A

A = une plage de lyse.

Boîtes ensemencées avec émulsion en eau peptonée.

Filtrat après culture de vingt-quatre heures en bouillon.

Quant à la répartition des divers groupes de variétés biochimiques de *S. gallinarum-pullorum* chez les oiseaux infectés en fonction de l'espèce et de l'âge, elle ne présente aucun intérêt précis, ainsi que l'évoquent ces résultats :

Pour *S. gallinarum* :

Groupe 1 : Toutes les souches proviennent de poules.

Groupe 2 : Une souche provient de pintade, deux souches de poules.

Groupe 3 : Deux souches issues de poules.

Groupe 4 : Deux souches issues de poussins.

Groupe 5 : Une souche provient de poussins.

Groupe 6 : Deux souches issues de poussins.

Groupe 7 : Une souche issue de poussins.

Pour *S. pullorum* :

Groupe 1 : Deux souches proviennent de poules, une de pintades, deux de poussins.

TABLEAU III.

N°	EPIDÉMIOLOGIE			CLINIQUE		BACTÉRIOLOGIE				SÉROLOGIE		LYSOTYPIC		ANTIGÈNESIBILITE				
	Répart. géograph.	Espèces affectées	Age	Forme de la mal.	Spontanée	morph. des colonies	petit lait	Dulcité	Amidon	SH2	d- lactate	Phages spécifiques	Phages non sp.	P	S	A	C	T
1	Rhône	poule	adulte	chronique		p. colonies	+	—	—	+	—			0	0	0	0	0
2	Basses Pyr.	poule	adulte	chronique		"	+	+	—	+	—	45-46		0	+	0	+	+
3	Loire	poule	adulte	chronique		"	—	—	+	+	—	31-45-46		0	+	0	+	0
4	Drôme	poulade	adulte	chronique		"	+	—	—	—	—			0	+	0	+	0
5	Drôme	poule	adulte	septicémique		"	+	+	—	—	—	31-45-46		0	+	0	+	+
7	Manche	poulet nouveau né		septicémique		"	—	—	—	—	+	31-45		+	+	+	+	+
8	Lot et Gar.	poulade	adulte	chronique		p. colonies	+	+	+	—	+	45		0	+	+	+	0
9	Loire	poule	adulte	chronique		p. colonies	—	—	+	+	—	31-32-35-46		0	+	0	0	+
10	Landes	poule	nouveau né	septicémique		"	—	—	+	—	—	45-46		0	0	+	+	0
11	B. du Rhône	poule	nouveau né	septicémique		"	+	—	—	—	+	31-15-46		0	+	0	0	+
12	Cher	poule	nouveau né	septicémique		"	—	+	+	—	+	31-45-46		0	+	0	+	+
13	Rhône	poule	nouveau né	septicémique		"	—	—	—	—	—			0	+	0	0	+
14	Côte d'Or	poule	nouveau né	septicémique		"	—	—	—	—	+	45		0	+	0	0	+
15	Yonne	poule	adulte	chronique		"	+	—	+	—	—			0	+	0	+	0
16	Htes Alpes	poule	adulte	chronique		"	+	+	+	+	—			0	+	0	0	0
17	Charentes	poule	nouveau né	septicémique		"	—	—	—	—	+	41-45-46		0	+	0	+	+
18	Drôme	poule	nouveau né	septicémique		"	+	—	—	—	—			0	+	0	+	+
19	Loire	poule	adulte	chronique		p. colonies	+	+	—	—	+			0	+	0	+	+
20	Drôme	poule	adulte	septicémique		p. colonies	+	+	—	+	+	45-46		0	+	+	+	+
21	Hte Savoie	poule	nouveau né	chronique		"	+	+	+	—	+	36-45		0	+	+	+	+
22	Saône et Loire	dindon	adulte	chronique		p. colonies	—	—	—	—	+	31		0	+	+	0	0
24	Hte Savoie	poule	nouveau né	septicémique		p. colonies	—	—	—	—	+			0	+	+	0	+
26	Côte d'Or	poule	nouveau né	septicémique		p. colonies	+	+	—	—	—			0	+	+	0	+

I, IX et XII

ne XII

très faible

33	Rhône	poule	nouveau né	septicémique	"	+	-	+	+	0	+	+	+	+
34	Dordogne	poule	nouveau né	septicémique	"	+	-	+	+	0	+	0	+	0
35	M. et Loire	poule	nouveau né	septicémique	"	-	-	-	+	0	+	+	+	+
36	Rhône	poule	nouveau né	septicémique	"	-	+	+	-	0	+	0	+	0
37	Saône et Loire	poule	nouveau né	septicémique	G.colonies	-	+	+	-	0	+	+	+	+
39	Allier	poule	nouveau né	septicémique	p.colonies	-	+	+	-	0	+	+	0	0
40	Loire	poule	adulte	chronique	G.colonies	+	-	+	+	0	+	0	+	+
41	Hérault	poule	nouveau né	septicémique	p.colonies	-	-	-	-	0	+	+	+	+
42	Rhône	poule	nouveau né	septicémique	"	-	+	-	+	0	+	0	0	0
43	Me Loire	poule	adulte	chronique	G.colonies	+	+	+	+	0	+	0	+	+
44	Nord	poule	nouveau né	septicémique	p.colonies	+	-	+	+	0	+	0	+	+
45	Saône et Loire	poule	nouveau né	septicémique	G.colonies	-	+	+	-	0	+	+	+	+
46	Me Marne	poule	nouveau né	chronique	p.colonies	+	-	-	-	0	+	0	0	0
48	Lot et Garonne	poule	nouveau né	septicémique	"	-	-	-	+	0	+	0	0	0
50	Rhône	poule	nouveau né	septicémique	G.colonies	-	+	+	-	0	+	+	+	+
52	Loiret	poule	nouveau né	septicémique	p.colonies	+	-	+	-	0	+	0	+	+
53	Cant.1	poule	nouveau né	septicémique	"	-	-	+	-	0	+	0	+	0
54	Cher	poule	nouveau né	septicémique	"	+	-	-	-	0	+	+	+	+
57	Loire	poule	nouveau né	septicémique	"	-	-	-	+	0	+	0	+	+
58	Me Saône -	poule	nouveau né	septicémique	G.colonies	+	-	-	-	0	+	+	+	+
60	Landes	poule	nouveau né	chronique	p.colonies	-	-	-	+	0	+	0	+	+

Ab

Prés

45

31 - 45

45 - 46

31 - 45

31-45-46

31-36-37  
45 - 46

31 - 45

31-36-37  
45-46

31 - 45

31-45-46

31-36-37  
45 - 46

31 - 45

31-36-37  
45-46

31 - 45

31-45-46

31-36-37  
45 - 46

31 - 45

31-45-46

31-36-37  
45 - 46

31 - 45



Groupe 2 : Quatre souches proviennent de poussins, une de poules, virant le xylose au bout de sept jours.

Groupe 3 : Deux souches proviennent de poussins. (Ce groupe est à rapprocher du groupe 6 dont il diffère simplement par le virage du dhamnose en quatre jours.)

Groupe 4 : Une souche découverte chez une poule.

Groupe 5 : Trois souches issues de poussins, une souche issue de poules.

Groupe 6 : Toutes les souches, au nombre de 8, proviennent de poussins.

Groupe 7 : Une souche mise en évidence chez le poulet.

Groupe 8 : Une *Salmonella pullorum* isolée chez une dinde.

Groupe 9 : Une souche isolée chez le poussin.

Il ressort de cette étude :

1° L'augmentation du nombre des groupes de variétés biochimiques de *S. gallinarum-pullorum* à mesure que l'on étend les recherches à un nombre plus élevé de souches et d'hydrates de carbone, déjà signalée par Virat, Vallée et Jacotot [6] ;

2° L'instabilité du caractère fermentaire, déjà signalée précédemment pour la dulcité et retrouvée pour d'autres hydrates de carbone, en accord avec les conclusions de Néel et coll. [4] ;

3° L'incapacité pour les caractères biochimiques accessoires, au même titre que pour les caractères biochimiques fondamentaux, de séparer *S. gallinarum* de *S. pullorum* ;

4° La possibilité néanmoins d'utiliser pour certaines enquêtes épidémiologiques, et sous toutes réserves, les variétés biochimiques de *S. gallinarum-pullorum* réunies en groupes distincts.

C. CARACTÈRES PATHOGÈNES. — 1° La reproduction de la typhose ou de la pullorose clinique, chez l'adulte ou le jeune, à l'aide des souches fraîchement isolées de *S. gallinarum* et *S. pullorum* n'a été tentée que deux fois, sans résultat net.

2° L'inoculation par voie intrapéritonéale à la souris d'une culture de 24 heures et la recherche, lot par lot, de la DL<sub>50</sub> n'a pu être menée à bien en raison du caractère onéreux de cette recherche. Tout au plus peut-on avancer :

a) Que l'inoculation à l'oiseau de *S. gallinarum* et *S. pullorum*, non effectuée systématiquement dans nos expériences, n'a pas réussi à fournir des résultats précis et concordants entre les mains des auteurs nous ayant précédés (7) ;

b) Que l'inoculation à la souris de *S. gallinarum* ou de *S. pullorum* se révèle constamment mortelle pour cette espèce et ne peut par conséquent servir de test de différenciation des deux germes, sauf peut-être en s'adressant à la détermination de la DL<sub>50</sub> différentielle de chaque bactérie, expérimentation onéreuse et à longue échéance, sortant de la pratique diagnostique courante.

(7) Voir à ce sujet G. Lesbouyries, *Pathologie des Oiseaux*, Vigot, éd., Paris, 1941.

## IV. — DISTINCTION SÉROLOGIQUE.

La formule antigénique de toutes les souches isolées de *S. gallinarum* s'est, contrairement aux autres tests, révélée d'une *fixité régulière*. C'est là l'indication formelle qu'il ne doit rien subsister de tous les essais de subdivision au sein de l'espèce *S. gallinarum*, entité sérologique unique.

Afin de préciser la constitution antigénique du facteur XII de nos souches, une étude systématique a porté sur la présence ou l'absence de l'antigène XII<sub>2</sub> grâce à un sérum spécifique. Aucune des 48 souches étudiées ne possédait ce facteur, *ce qui refuse à la recherche du facteur XII<sub>2</sub> un intérêt considérable dans les enquêtes épidémiologiques* basées sur les caractères sérologiques de *Salmonella* (Cf. tableau III.)

## V. — DISTINCTION LYSOTYPIQUE.

Intimement liés parfois à la constitution antigénique, si remarquable par sa fixité, les caractères lysotypiques pouvaient être aptes théoriquement à fournir des résultats valables pour la distinction des deux espèces.

Dans l'impossibilité d'obtenir des souches de phages spécifiques pour *S. gallinarum* isolées par d'autres auteurs, nous avons dû entreprendre nous-mêmes l'*isolement de phages spécifiques*, ou utiliser des souches de *phages non spécifiques*, dans l'espoir qu'une paraspécificité de leur action pourrait éventuellement servir de base à une classification.

A. PHAGES SPÉCIFIQUES. — Conformément à la technique classique, nous avons recherché la lysogénéité des filtrats de 12 souches :

6 souches de *S. gallinarum* (dulcite +) n<sup>os</sup> 19, 20, 21, 37, 43 et 50 ;

6 souches de *S. pullorum* (dulcite —) n<sup>os</sup> 17, 32, 33, 34, 35 et 41,

d'une part, sur 12 souches d'espèces bactériennes variées provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Paris (D<sup>r</sup> P. Nicolle) et choisies parmi des Entérobactéries Gram — (donc proches de *Salmonella*) :

1. Y 6R Dysenterie.
2. Bucarest (R) *Shiga*.
3. *Shiga* sensible à 1 bactériophage *coli* Lisbonne.
4. *Shiga* dysentérique Dopter.
5. *Shiga* 105 (Brazzaville).
6. *Shiga sonnei* Sol<sub>4</sub>.
7. *Coli* C.

- 8. *Coli* Legroux 11 g.
- 9. *Coli* M. L. 32.
- 10. Flexner type X.
- 11. Pyocyanique 181.
- 12. Pyocyanique 182.

d'autre part, sur les 12 souches de *S. gallinarum-pullorum* répertoriées ci-dessus (donc vis-à-vis d'elles-mêmes).

Les résultats se sont révélés en grande partie négatifs, c'est-à-dire qu'il est difficile d'isoler des bactériophages actifs à partir de souches de *S. gallinarum-pullorum* éventuellement lysogènes.

Seuls les filtrats de 3 souches (n<sup>os</sup> 32, 34 et 37, soit 1 souche de *S. gallinarum* et 2 souches de *S. pullorum*) contenaient des phages plus ou moins actifs sur 7 souches (n<sup>os</sup> 17, 33, 35, 41, 19, 20 et 43) selon le tableau suivant :

Filtrats .....		32	34	37
		—	—	—
Souches .....	17	6A	2A	O
Souches .....	33	5A	1A	2A
Souches .....	35	1A	O	2A
Souches .....	41	4A	1A	6A
Souches .....	19	3A	1A	5A
Souches .....	20	1A	O	2A
Souches .....	43	1A	O	3A

A = une plage de lyse phagique.

Dans une autre série d'expériences, 8 souches sur 37 de *S. gallinarum-pullorum* ont été découvertes lysogènes, leurs filtrats déterminant des lyses phagiques sur la culture d'autres souches que celles qui avaient servi à les préparer (Cf. tableau II).

Ainsi il ressort que les filtrats de souches de *S. gallinarum-pullorum* :

1° Ne montrent aucune action bactériophagique sur des souches de bactéries proches des *Salmonellae* mais n'appartenant pas cependant à cette espèce, non plus que les souches qui ont servi à les préparer ;

2° Montrent rarement une action bactériophagique (3 souches sur 12, puis 8 souches sur 37, soit environ 25 p. 100 des cas), sur des souches de *S. gallinarum-pullorum*.

De plus, cette lysogénéité paraît, malgré l'indigence de nos expériences :

*Faible* (quelques plages de lyse sans confluence), caractère vraisemblablement dû à la pauvreté en phages des filtrats et à leur petitesse ou à ces deux causes réunies ;

*Labile* (inactivation en cinq jours), ce qui prouve la fragilité de ces phages à la température ordinaire et à la lumière et pose ainsi des problèmes pratiques délicats quant à la conservation

de ces souches phagiques au laboratoire et à la lysotypie systématique de ces bactéries.

B. PHAGES NON SPÉCIFIQUES. — Quelques cas d'action phagique non spécifique ont été enregistrés à la suite de la mise en contact de 12 souches de phages ou de mélanges de phages très divers (coliphage, dysentérophage, phage *coli* Bordet, *Salmonella para* B, phage Ananian, Cayot et anti-O<sub>2</sub> type I, typhiphage T105 et BgeT (Lister/Lister H901) avec nos souches de *S. gallinarum-pullorum*. Ces résultats fragmentaires paraissent peu intéressants et incapables de fournir les éléments d'une lysotypie systématique de l'espèce bactérienne.

On peut donc conclure que *ni les phages spécifiques, ni les phages non spécifiques ne semblent capables de fournir les éléments d'une distinction lysotypique entre S. gallinarum et S. pullorum ou entre divers groupes lysotypiques utilisables pour les enquêtes épidémiologiques.*

## VI. — DISTINCTION PAR L'ANTIBIOSENSIBILITÉ.

Le mécanisme intime de l'action des antibiotiques porte sur les chaînes métaboliques fondamentales des bactéries. Aussi pouvait-on espérer déceler quelques disparités de comportement de *S. gallinarum* et *S. pullorum* vis-à-vis des principaux antibiotiques utilisables en pratique pour étayer une classification biochimique « indirecte ». Les souches ont été systématiquement testées vis-à-vis de la pénicilline, de la streptomycine, de l'auroéomycine, de la chloromycétine et de la terramycine, grâce à la méthode des disques de l'Institut Pasteur.

Les résultats sont les suivants (Cf. tableau III) :

*Pénicilline* : 1 souche sensible, soit 0,5 p. 100.

*Streptomycine* : 45 souches sensibles, soit 92 p. 100.

*Auréomycine* : 17 souches sensibles, soit 35 p. 100.

*Chloromycétine* : 13 souches sensibles, soit 28 p. 100.

*Terramycine* : 17 souches sensibles, soit 35 p. 100.

Ces résultats ne concordant nullement avec les autres tests distinctifs et en particulier la fermentation de la dulcité, il ressort que *l'antibiosensibilité ne peut servir à séparer S. gallinarum et S. pullorum et qu'aucune classification de groupe ne semble possible en s'appuyant sur ce test, d'autant que l'apparition de l'antibiorésistance peut frapper d'instabilité ce caractère.*

En résumé, *aucun des 6 tests interrogés (épidémiologique, clinique, bactériologique, sérologique, lysotypique ou antibiotique) ne paraît apte à séparer S. gallinarum et S. pullorum, ni capable de distinguer un certain nombre de groupes utilisables pour les enquêtes épidémiologiques.*



Si l'on se réfère en effet aux seuls *tests biochimiques classiques*, 9 souches sur 48, soit 20 p. 100 environ, sont différenciables en toute certitude. Si l'on étend les tests de différenciation à l'épidémiologie, la clinique et la biochimie, 4 souches seulement (soit 8 p. 100 environ) sont identifiables :

L'une correspondant à *S. gallinarum* (n° 19) ;

L'autre à *S. pullorum* (n°s 18, 34 et 52).

Si l'on considère enfin les divers tests à la fois, épidémiologique, clinique, bactériologique, sérologique, lysotypique et antibiotique, *aucune différenciation ne demeure possible* entre *S. gallinarum* et *S. pullorum*, non plus qu'entre les groupes de variétés séparables par ces divers tests.

Il n'existe donc qu'une seule espèce définie par une formule sérologique commune : l'espèce *S. gallinarum-pullorum*.

## VII. — CONSÉQUENCES PRATIQUES.

Ainsi, la théorie uniciste qui soutient l'unicité et l'indivisibilité de *S. gallinarum* et *S. pullorum* semble devoir triompher de la thèse scholastique dualiste, qui différenciait les deux germes en les opposant par certains de leurs caractères.

Déjà affirmée par de nombreux chercheurs, cette conclusion induit des conséquences pratiques d'un grand intérêt, en particulier pour la lutte contre l'un de ces fléaux de l'aviculture :

1° Dans la *pathogénie* de ces infections, un même schéma peut être invoqué et à l'espèce *S. gallinarum-pullorum* correspond en clinique la maladie *Typhose-Pullorose* avec :

a) Le plus souvent, infection septicémique du fœtus ou du poussin et entretien d'une maladie chronique chez l'adulte reproducteur, au sein de la sphère génitale ;

b) Exceptionnellement, une inversion du schéma précédent (maladie septicémique de l'adulte et chronique du jeune).

Ce sont des « maladies de l'élevage » typiques, sortes « d'avortement contagieux des volailles ».

2° Dans le *diagnostic*, l'*isolement direct* d'une souche à partir d'un poussin (cœur, rate ou cerveau) ne pose plus aucun problème d'identification, dès l'instant où s'est révélée la formule sérologique spécifique. Cette simplification diagnostique concerne également le *dépistage sérologique* par *hémou- ou séro-agglutination* effectuée sur les adultes atteints de la forme chronique de la maladie.

En effet, il n'importe nullement de préparer des *antigènes* concentrés colorés à partir de diverses souches de *S. gallinarum* ou *S. pullorum* séparées par leurs caractères biochimiques. Possédant la même formule sérologique de base, seules seront sélectionnées dans ce but les souches *fortement antigéniques*

(« dominantes antigéniques »), en évitant toutes formes naines à antigénicité réduite.

Tout au plus pourra-t-on songer à utiliser des souches possédant l'antigène XII<sub>2</sub>, du moins dans les régions ou pays dans lesquels des souches nanties de cet antigène sont régulièrement isolées, puisque l'agglutination serait alors plus rapide et plus franche. Il ne paraît pas être indispensable de considérer ce détail en France, où ce facteur antigénique accessoire ne paraît pas être régulièrement représenté.

Plus souhaitable apparaît l'utilisation simultanée de deux antigènes pour hémo- ou séro-agglutination :

a) *Un antigène S. gallinarum-pullorum* dûment sélectionné, préparé et conservé, puisque la plupart des maladies du groupe typhose-pullorose se réclament d'une étiologie commune : *S. gallinarum-pullorum*.

b) *Un antigène mélange des salmonelles d'autres groupes* (en particulier B, C et D) qui furent isolées de syndromes paratyphiques aviaires. Ainsi, le diagnostic de la maladie s'effectuerait de la même manière que celui du microbe, en utilisant des réactifs-mélanges destinés à dépister les rares maladies salmonelliques aviaires ne reconnaissant pas *S. gallinarum-pullorum* à l'origine. A l'appui de notre suggestion, il est possible d'apporter deux observations qui soulignent l'intérêt de ce double diagnostic, en particulier pour les élevages avicoles à plusieurs espèces (poules, canards, oies, dindons, etc.).

3° *En prophylaxie sanitaire* : La prophylaxie médicale n'étant ni rentable, ni souhaitable, l'intertransmissibilité des diverses espèces de *Salmonellae* aux diverses espèces d'oiseaux (et quelquefois de mammifères) exige de *compartimenter les divers élevages* afin de réduire les risques de contagion.

Quant aux *enquêtes épidémiologiques* destinées à reconnaître l'enchaînement des contagions successives, aucun test n'apporte de certitude (biochimie, sérologie, lysotypie, antibiosensibilité) :

a) En raison de la *fragilité* et de l'*arbitraire* de toute classification de groupes de variétés ;

b) En raison de l'*instabilité* et de la *contingence* de chacun des caractères retenus.

Il s'agit néanmoins d'un problème important dans le cadre de la *prophylaxie collective à forme syndicale* que revêt la lutte antipullorique en France (8) et de la garantie dans les ventes et achats d'œufs, de poussins ou de reproducteurs. Aussi serait-il souhaitable qu'une vaste expérimentation vienne mettre un point final à ce problème dans un sens favorable ou défavorable.

(8) Voir à ce sujet l'excellente monographie de Decroix, *La garantie dans la pullorose*, Thèse doct. vétér., Bosc., édit., Lyon, 1955.

4° En thérapeutique enfin, la recherche systématique de l'antibiosensibilité permet de s'adresser directement à l'antibiotique pleinement actif. On sait cependant l'inefficacité et la non-rentabilité de la thérapeutique de la typhose-pullorose, surtout pour traiter les formes chroniques des adultes.

De plus, cette recherche de l'antibiosensibilité des souches fraîchement isolées est devenue absolument nécessaire depuis la généralisation de l'antibioprévention des maladies parasitaires ou bactériennes des oiseaux grâce à des « cocktails » dont le seul effet certain est d'engendrer des antibiorésistances désormais irréductibles. A l'appui de cette condamnation de l'antibioprévention systématique en aviculture, nous pouvons encore apporter deux observations qui prouvent en particulier l'impossibilité d'arrêter une enzootie de salmonellose aiguë à l'aide des antibiotiques utilisés dans le complexe préventif.

#### CONCLUSIONS.

1° Quarante-huit souches de *Salmonella gallinarum* et *S. pullorum* ont été étudiées sur les plans épidémiologique, clinique, bactériologique, sérologique, lysotypique et antibiotique.

2° La thèse dualiste classique qui permet de séparer ces deux bactéries ne paraît pas devoir être soutenue, au bénéfice de la thèse uniciste qui ne considère qu'une seule et même espèce sérologique : *S. gallinarum-pullorum*, de formule sérologique immuable, mais divisible en une foule de variétés, inclassables en groupes définis.

3° A cette unicité étiologique correspond une unicité clinique : la typhose-pullorose, dont les manifestations sont superposables dans tous les cas, aux détails près.

4° Les conséquences pratiques pour le dépistage et la lutte anti-pullorique sont envisagées dans un dernier chapitre.

#### SUMMARY.

1° Forty-eight strains of *S. gallinarum* and *S. pullorum* have been studied from the epidemiological, clinical, bacteriological, serological, phage-typing and antibiotic point of view.

2° It does not appear possible to differentiate these two bacteria. They probably form one single serological species, *S. gallinarum-pullorum*, with one serological formula, but which can be divided into very many varieties, impossible to classify into definite groups.

3° To this etiological unity correspond a clinical unity : the typhose-pullorose, the manifestations of which are always identical but for a few details.

4° Practical implications for the control of the disease are discussed.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. KAUFFMANN. *Enterbacteriaceae*. Munksgaard, édit., Copenhague, 1951 et 1954.
- [2] L. DELPY et RASTEGAR. *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **61**, 636.
- [3] A. LUCAS, L. ANDRAL, G. BOULEY, A. PARAF et C. QUINCHON. *Rec. Méd. Vét.*, 1951, **9**, 547.
- [4] R. NÉEL, L. LE MINOR et HUSSEIN-TASLIMI. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 719.
- [5] F. SCHOENAERS, A. KAECKENBEECK et H. SAFARPOOR. *Ann. Méd. Vét.*, 1955, **99**, 40.
- [6] B. VIRAT, A. VALLÉE et R. JACOTOT. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 133.



# ÉTUDES SUR LE COLLAGÈNE

(nouvelle série)

## VI. — DE L'ACTION EXERCÉE PAR DES ENDOTOXINES ET DES POLYOSIDES BACTÉRIENS SUR DES SOLUTIONS DE COLLAGÈNE A.

par SUZANNE BAZIN, ALBERT DELAUNAY et MICHELLE HÈNON (\*).

(C. N. R. S. et Institut Pasteur, Annexe de Garches)

### Introduction.

Dans un mémoire précédent [1], nous avons montré qu'un extrait bactérien, tel l'endotoxine isolée du bacille typhique, peut se combiner, *in vitro*, avec un collagène acido-soluble (collagène A de Nageotte). Ce fait, par son originalité, nous a incité à pousser davantage notre étude. Nous dirons, dans ce nouveau Mémoire, ce que nous avons vu, en étudiant les combinaisons qui se forment quand on réunit, en tubes, du collagène A et différents principes bactériens.

### Matériel utilisé.

#### I. — SOLUTION DE COLLAGÈNE A.

Elle est faite selon les conditions désormais classiques indiquées par Nageotte [2]. Les tendons de deux queues de rats adultes sont maintenus dans 100 ml d'eau acétifiée au 1/10 000, à + 4°, pendant quarante-huit heures. Puis, filtration sur gaze. Nous n'avons utilisé que des préparations limpides, âgées au maximum de 4 jours ; pH : 4,3 ou 4,4. Se trouve dissous, par millilitre de liquide, environ 1 mg de collagène.

#### II. — PRINCIPES BACTÉRIENS.

A. ENDOTOXINES DE « SALMONELLA ENTERITIDIS » ET D'« ESCHERICHIA COLI ». — Ces endotoxines ont été extraites des germes correspondants, puis purifiées, selon les techniques de A. Boivin.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 février 1956.

B. POLYOSIDE STAPHYLOCOCCIQUE. — Les staphylocoques qui ont poussé sur gélose sont, après lavages à l'eau physiologique, traités pendant quarante-huit heures à  $+ 4^{\circ}$  par de l'acide trichloracétique N/2. Après centrifugation de cette préparation, le liquide surnageant est dialysé, puis concentré dix fois par évaporation. Cette nouvelle préparation est soumise à des précipitations fractionnées par l'alcool, puis desséchée sous vide. Le principe obtenu (nous l'appellerons dans ce qui suit : POst) est un polyoside staphylococcique ; il est très aisément soluble dans l'eau distillée.

Voici ses principaux caractères :

1° Réactions faites sur le polyoside en solution : Molisch,  $+++$  ; Bial,  $+$  ; Millon,  $\pm$  ; Biuret et Tanret, 0 ; Fehling et Iode, 0.

2° Réactions faites après hydrolyse des solutions pendant trois heures en présence de ClH N : Orcinol (aldohexoses),  $+\pm$  ; Ehrlich (hexosamines),  $++\pm$  ; Tollens (acides uroniques),  $+$  ; Tauber (pentoses),  $+$  ; Séliwanoff (cétohexoses), 0 ; Phosphore,  $+$  (moins de 1 p. 100) ;  $SO_4H_2$ , 0.

C. POLYOSIDE TYPHIQUE. — A une solution renfermant 2 mg d'endotoxine typhique par millilitre, est ajouté de l'acide acétique 5 N en quantité telle que la concentration finale en acide soit de N/4. La préparation est chauffée au bain-marie à reflux pendant sept heures, puis elle est filtrée sur papier sans cendres, enfin desséchée par évaporation. Le résidu repris par une petite quantité d'eau distillée est finalement précipité par l'alcool puis desséché sous vide. La poudre obtenue, blanc jaunâtre, parfaitement soluble dans l'eau, est le *polyoside typhique*.

Voici, tels que nous avons pu les déceler, ses principaux caractères :

1° Réactions faites sur le polyoside en solution : Molisch,  $++++$  ; Bial,  $\pm$  ; Fehling et Iode, 0 ; Biuret, Tanret et Millon, 0.

2° Réactions faites après hydrolyse des solutions pendant trois heures en présence de ClH N : Orcinol,  $++++$  ; Tauber,  $++$  ; Séliwanoff, 0 ; Ehrlich,  $+$  ; Tollens, 0 ; Phosphore,  $+$  (moins de 1 p. 100) ;  $SO_4H_2$ , 0.

A titre comparatif, nous donnerons également les principaux caractères de l'endotoxine d'où avait été extrait le polyoside typhique.

1° Réactions faites sur l'endotoxine en solution : Molisch,  $++++$  ; Bial,  $\pm$  ; Fehling, Iode, Biuret, Tanret et Millon, 0.

2° Réactions faites après hydrolyse des solutions pendant trois heures en présence de ClH N : Orcinol,  $++++$  ; Tauber,  $++$  ; Séliwanoff, 0 ; Ehrlich,  $+\pm$  ; Tollens, 0 ; Phosphore,  $+\pm$  ;  $SO_4H_2$ , 0.

## Résultats.

## I. — AVEC LES ENDOTOXINES.

A. AVEC L'ENDOTOXINE EXTRAITE DE « SALMONELLA ENTERITIDIS ». — 1° *Expérience de base.* — A 1 ml d'une solution de collagène A est ajouté 1 ml d'une solution d'endotoxine, elle-même ajustée à pH 4,3. *Formation assez lente d'un précipité macroscopiquement amorphe.*

2° *Conditions d'apparition de la réaction.* — a) Le précipité formé est assez abondant quand ont été mis en œuvre 3 ou 2 mg d'endotoxine. Dans ce précipité, se trouvent à la fois de l'endotoxine et du collagène (le liquide surnageant n'est pas opalescent ; il a perdu en tout ou partie la fluorescence aux U.V., caractéristique des solutions d'endotoxine, et il donne une réaction de Molisch négative ou faible. Par ailleurs, il ne précipite pas, comme le ferait une solution de collagène A normale, quand on le traite par le ClNa).

b) La combinaison collagène-endotoxine se fait mal pour une dose d'endotoxine de l'ordre du milligramme ; on retrouve alors dans le surnageant un reliquat des deux substances.

c) Dans nos conditions d'expérience, dose précipitante limite de l'endotoxine : 0,5 mg.

3° *Caractères du précipité endotoxine-collagène.* — Un précipité obtenu en présence de 3 mg d'endotoxine, remis en suspension dans 2 ml d'eau acétifiée (pH 4,3), est dissocié (e. g. : dissous) quand on le chauffe trois minutes à 43°.

B. AVEC L'ENDOTOXINE EXTRAITE D' « ESCHERICHIA COLI ». — Mêmes observations que ci-dessus, à deux remarques près : a) la dose précipitante limite correspond ici à 0,25 mg d'endotoxine ; b) la température de dissociation du précipité est, cette fois, de 48°.

## II. — AVEC LE POLYOSIDE STAPHYLOCOCCIQUE.

1° *Expérience de base.* — A 1 ml d'une solution de collagène A est ajouté 1 ml d'eau distillée contenant en solution 1 mg du polyoside staphylococcique défini ci-dessus (POst) et dont le pH a été ajusté à 4,3. *Apparition immédiate d'un précipité nettement fibrillaire* et assez abondant dans un liquide légèrement visqueux.

2° *Conditions d'apparition de la réaction.* — a) L'ensemble de nos expériences nous a montré ici que le précipité qui se forme quand on met en présence 1 ml de collagène dissous (soit environ 1 mg) et 1 ml (0,25 mg) de POst entraîne *tout le collagène* (du

ClNa ajouté au surnageant ne donne aucune précipitation) et la majeure partie du polyoside. En présence de doses plus faibles de polyoside, reste en solution un excès de collagène ; en présence de doses plus fortes, un excès de polyoside.

b) La précipitation collagène-POst peut se faire dans une zone de pH comprise entre 3 et 7,2. Maximum de précipitation : de pH 3,5 à pH  $\pm$  6.

c) Le chauffage préalable de la solution de collagène pendant trois minutes à 40° altère déjà suffisamment la protéine pour modifier sa combinaison avec le POst ; on obtient alors un précipité fibrillaire moins abondant que normalement. Avec un collagène chauffé trois minutes à 42°, obtention d'un simple précipité amorphe. Ce précipité amorphe se dissout à 54°.

d) Après huit heures de contact avec le formol (au 1/40), le collagène précipite moins bien quand il est mis en présence du POst. Le précipité collagène formolé-POst garde cependant un aspect fibrillaire. Stable à la chaleur, il subit une contraction forte à 70°.

3° *Caractères du précipité collagène-POst.* — a) *Influence du pH.* — Des précipités collagène-POst sont placés dans de l'eau distillée amenée à différents pH. *Observations :* A pH 2 et 3, dissolution presque totale du précipité ; à pH 3,5, légère dissolution ; entre pH 4,3 et pH 8, aucune modification du précipité ; à pH 10, dissolution partielle ; à pH 11, dissolution totale.

b) *Influence d'agents connus pour dissocier les liaisons H.* — Des précipités collagène-POst sont placés dans la formamide pure ou dans de l'eau distillée contenant en solution les corps suivants (colonne de gauche) ; colonne de droite : résultats observés.

Formamide pure .....	Dissolution totale du précipité.
Salicylate de Na (0,427 M) .....	Dissolution totale du précipité.
Iodure de Na (1,7 M) .....	Dissolution totale du précipité.
Br Li (0,85 M) .....	Dissolution totale du précipité.
Br Li (0,427 M) .....	Le précipité reste intact.
Cl <sub>2</sub> Ca (de 0,05 M à 0,6 M) .....	Dissolution totale du précipité.

c) *Influence de la chaleur.* — Les précipités collagène-POst sont dissociés (dissous) quand ils sont chauffés trois minutes à 54°. Cl<sub>2</sub>Ca abaisse la température de dissolution à 48° (0,01 M) ou à 50° (0,005 M).

d) *Peut-on renforcer la combinaison collagène-POst ? — Action du formol.* — Des précipités collagène-POst sont recueillis par centrifugation et remis en suspension dans 2 ml de formol à 1 p. 100, 2 p. 100, 5 p. 100 ou 10 p. 100. Le contact est maintenu pendant trois heures à 37°. On remarque alors que tous les précipités se sont condensés (la condensation la moins forte ayant lieu dans la solution de formol à 1 p. 100). On peut



remarquer aussi que le formol rend les précipités collagène-POst plus stables à la chaleur (dissolution partielle seulement à 70°).

*Action de l'acide tannique.* — Ce corps ne modifie pas l'aspect normal des précipités collagène-POst mais, comme le formol, il a la propriété de les rendre plus stables à la chaleur. Cela est particulièrement vrai quand on a employé l'acide tannique au 1/1 000 et au 1/100.

*Remarque.* — Dans quelques expériences, nous avons employé un *polyoside staphylococcique moins purifié* (1) que celui utilisé ci-dessus. Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont été comparables. Quelques différences de détail pourtant. Ainsi, quand ce nouveau polyoside était mis en œuvre, une concentration de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  de l'ordre de 0,02 M suffisait pour dissoudre complètement les précipités ; pour dissocier ces précipités par la chaleur, il fallait atteindre 56° ; à 60°, la combinaison avec le collagène chauffé était encore stable.

### III. — AVEC LE POLYOSIDE TYPHIQUE.

1° *Expériences de base.* — A 1 ml d'une solution de collagène A est ajouté 1 ml d'eau distillée contenant en solution 3 mg du polyoside typhique défini ci-dessus et amenée à pH 4,3. *Le mélange reste limpide.*

A 1 ml de la même solution de collagène est ajouté 1 ml d'eau distillée contenant en solution 2 mg de polyoside typhique et amenée à pH 9. Cette fois apparaît, dans un liquide visqueux, un *précipité fait de fibrilles mal formées, gélatineuses.*

Quand se trouve en cause le polyoside typhique, il faut donc, pour obtenir une précipitation, opérer à un pH *anormalement élevé.*

2° *Conditions d'apparition de la réaction.* — a) En travaillant dans nos conditions habituelles (mélange des deux solutions en parties égales), nous avons trouvé que la dose précipitante minimum de polyoside était de 0,5 mg. En présence de cette dose, la combinaison entre les deux produits se fait d'ailleurs assez mal puisqu'on retrouve un reliquat des deux dans le surnageant. En présence de 2 ou de 1 mg de polyoside typhique, tout le collagène semble précipité ; utilisé à la dose de 2 mg, on trouve un excès de polyoside dans la solution.

b) *Influence du pH.* — Dans nos conditions d'expérience, 1 mg de polyoside typhique représente une quantité suffisante pour précipiter le collagène A dans une zone de pH qui va de 5 à 10. Cette zone, on le voit, est assez peu étendue, surtout du côté

(1) Il contenait un peu plus de phosphore et des traces de protéines.

des pH acides. La précipitation se fait le mieux, semble-t-il, à pH 9.

c) Une solution de collagène A ne précipite plus en présence de polyoside typhique quand elle a été *chauffée* trois minutes à 40°.

d) Le collagène formolé au 1/40, mis en présence de polyoside typhique, précipite moins bien que le collagène normal lorsque le contact avec le formol a excédé sept heures.

3° *Caractères du précipité collagène-polyoside typhique.* —

a) Ce précipité, après lavage, contient encore du polyoside, mais il le contient en quantité très faible, notamment en quantité inférieure à celle qui paraissait avoir été soustraite au surnageant, au moment de la formation du précipité. On peut donc admettre que le simple lavage a enlevé une certaine quantité du polyoside adsorbé sur le précipité. Dans ces conditions, la combinaison collagène-polyoside typhique mérite d'être considérée comme une *combinaison peu stable*.

b) *Influence du pH.* — Des précipités collagène-polyoside typhique sont placés dans de l'eau distillée amenée à différent pH. *Observations* : A pH 4,3, dissolution totale du précipité. Entre pH 5 et pH 10, le précipité reste inaltéré ; à pH 11, dissolution partielle du précipité ; à pH 12, dissolution totale.

c) *Influence de la chaleur.* — Des précipités collagène-polyoside typhique sont remis en suspension dans 2 ml d'eau distillée amenée à pH 9. Puis, ils sont chauffés à différentes températures pendant trois minutes. A 45° et à 48°, aucun changement d'aspect des précipités. A 50°, début de dissolution. A 52°, dissolution totale des précipités.

d) *Influence du  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .* — Un précipité collagène-polyoside typhique se dissout totalement quand il est mis en présence de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,01 M.

e) *Influence du formol.* — Le collagène formolé au 1/40 donne avec le polyoside typhique un précipité qui est plus stable à la chaleur que celui obtenu avec le collagène normal. La température de contraction est, en ce cas, de 56°.

### Discussion.

Pour cette discussion, nous tiendrons compte, non seulement des faits apportés dans ce Mémoire mais, également, de ceux exposés dans notre précédent travail [1] et que nous avons alors laissés sans commentaires.

I. Quand, à une solution de collagène A normal, on ajoute des endotoxines ou des polyosides bactériens, on observe, en tous cas,

une *précipitation*. Mais cette *précipitation* apparaît fort variable d'un principe bactérien à l'autre.

a) On peut noter, en premier lieu, que la *dose précipitante optimum* n'est pas la même pour les endotoxines et les polyosides.

Plus précisément, elle est de 3 mg pour les endotoxines extraites de *S. typhi*, *S. enteritidis* et *E. coli*, de 1 mg pour le polyoside typhique et de 0,5 mg pour le polyoside staphylococcique que nous avons aussi utilisés.

b) De même varient, selon la nature de la substance précipitante, les *limites de pH* où peut être obtenue une *précipitation*. Ces limites sont comprises, pour l'endotoxine typhique, entre 1,5 et 10,5, pour le polyoside typhique entre 5 et 10, pour le polyoside staphylococcique entre 3 et 7,2.

II. Considérons maintenant les *caractères des précipités eux-mêmes*. En ce cas encore, on peut noter, selon la nature du corps précipitant, des différences assez sensibles.

a) Ainsi, les précipités formés en présence des endotoxines, qui ont tous le même *aspect*, sont macroscopiquement amorphes (au microscope, on y décèle des fibres courtes). Dans les précipités formés en présence de polyoside typhique, on trouve des fibres gélatineuses. Au contraire, quand il s'agit de polyoside staphylococcique, les fibres que l'on voit sont longues, fines, agrégées.

b) Autre différence. Celle-ci tient à l'*action de la chaleur*. La température de dissolution trouvée a été :

- pour le précipité collagène-endotoxine typhique, de 56°.
- pour le précipité collagène-endotoxine Danysz, de 43°.
- pour le précipité collagène-endotoxine colibacillaire, de 48°.
- pour le précipité collagène-polyoside typhique, de 52°.
- pour le précipité collagène-endotoxine staphylococcique, de 54°.

III. Les expériences rapportées ci-dessus ont montré que, dans les précipités obtenus, se trouvent à la fois le collagène et le principe bactérien utilisé comme agent précipitant. Peut-on ajouter qu'il existe une véritable *combinaison* entre les principes présents dans le précipité ? La chose paraît assez vraisemblable ; il faut pourtant ajouter qu'il doit s'agir en tous cas de *combinaisons peu stables* (puisqu'on peut les dissocier par de faibles concentrations de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  et qu'on finit toujours par les rompre au moyen du chauffage) du type interactions par liaisons H de faible énergie.

A en juger du moins par l'effet de la chaleur, la plus stable serait la combinaison collagène-endotoxine typhique. Pour d'autres raisons, sur lesquelles nous avons insisté dans la partie expéri-

mentale, la moins stable serait la combinaison collagène-polyoside typhique. Dans ces conditions, comment expliquer que la dose précipitante optimum est de 3 mg dans le cas de l'endotoxine typhique et de 1 mg seulement dans le cas du polyoside typhique ? Nous voyons au moins deux explications. La première repose sur une influence possible du poids moléculaire. Voici la seconde à laquelle nous donnerions volontiers notre préférence. Dans la molécule d'endotoxine, existerait une fraction (lipidique ?) qui manifesterait une forte affinité pour le collagène (d'où la stabilité de la combinaison) mais qui, dans son action, serait fortement gênée par une autre fraction (polyosidique ?). Un complexe glucido-lipidique n'est-il pas, après tout, un type de molécule à groupements hydrophiles et hydrophobes, donc de molécule capable de former des associations intermoléculaires de structure variable selon les milieux ?

IV. A propos des faits observés avec le *collagène chauffé*. Ici, on peut trouver trois types de combinaisons différentes.

a) *Ainsi, les précipités collagène chauffé-polyoside staphylococcique sont amorphes.* On retrouve ici ce qui se passe quand on utilise dans les mêmes conditions, comme agent précipitant, un extrait de cordon ombilical humain [3], les polyosides du carrageaheen [4], l'héparine [5], un polyoside de levure [6], etc. Dans tous ces cas, sans doute, une fibrillogénèse ne peut prendre place que si le collagène a une structure intacte.

b) *Quand on ajoute à un collagène chauffé une solution de polyoside typhique, aucune précipitation n'apparaît.* Cette fois, les choses rappellent ce qui se passe avec le chlorure de sodium. Ce sel, à fortes concentrations, perd également son pouvoir précipitant sur la solution de collagène A quand celle-ci a été chauffée au préalable.

c) Rappelons enfin que le *précipité collagène chauffé-endotoxine typhique ressemble tout à fait, macroscopiquement, au précipité collagène normal-endotoxine*. Il est toutefois beaucoup moins stable à la chaleur (précisons qu'il se dissout à 45° alors que le précipité collagène normal-endotoxine se dissout seulement à 56°).

V. A notre avis, les faits rapportés dans ce Mémoire offrent un double motif d'intérêt.

a) Le premier, c'est d'être entièrement originaux.

b) Le second, c'est qu'ils nous apprennent que des principes bactériens de nature polyosidique peuvent, comme les mucopolysaccharides acides qu'on peut extraire du tissu conjonctif, contracter des liaisons avec le collagène.



Or, on sait qu'à l'origine de certaines « affections du collagène » interviennent certainement des microbes.

Dans ces conditions, on a le droit de se demander si ces affections ne résultent pas de la mise en place de liaisons collagène-mucopolysaccharides rendues défectueuses par entrée en compétition de polyosides (ou autres principes) bactériens anormalement présents dans nos tissus.

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs ont étudié *in vitro* les précipitations qui se produisent quand on ajoute à un collagène soluble (collagène A) différents extraits bactériens : endotoxines diverses, polyosides staphylococcique et typhique.

Ces précipitations, d'un cas à l'autre, sont variables. Elles sont influencées notamment par la nature de l'agent précipitant, le pH du milieu, l'état normal ou non du collagène...

D'un cas à l'autre, les précipités obtenus sont eux aussi différents, par leur aspect aussi bien que par leurs caractères.

De telles précipitations résultent-elles d'une véritable *combinaison* entre les corps en présence ? C'est probable.

Dans ces conditions, on est obligé de se demander si des combinaisons du même genre n'ont pas lieu également *in vivo*. Par là même, on se trouve conduit à envisager la pathogénie des « affections du collagène » sous un angle nouveau.

Que soient remerciées M<sup>lles</sup> M. Henrion et E. Rieuf, aides-techniques, du concours précieux qu'elles nous ont apporté pour ce travail.

#### SUMMARY.

The authors have studied *in vitro* the precipitations which occur when different bacterial extracts (endotoxines, polysaccharides of *Staphylococcus* and *B. typhi*) are added to a soluble collagen (collagen A).

These precipitations are different from one case to another. They are influenced by the nature of the precipitating agent, the pH of the medium, the state (normal or not normal) of the collagen...

From one case to the other, the precipitates are also different in their appearance as well as in their characters.

Do such precipitations result from an actual combination between the compounds in presence ? It is probable. Would it not be possible, then, that similar combinations occur *in vivo* ? If it were possible, we should have to consider the « collagen diseases » under a new angle.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. DELAUNAY, S. BAZIN et M. HENON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 258.
- [2] J. NAGEOTTE. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 828.
- [3] A. DELAUNAY, S. BAZIN, R. FAUVE et M. HENON. *Revue franç. d'Etudes cliniques et biologiques*, 1956, **1**, 165.
- [4] A. DELAUNAY, S. BAZIN et M. HENON. *Semaine des Hôpitaux de Paris* (sous presse).
- [5] S. BAZIN et A. DELAUNAY. *Semaine des Hôpitaux de Paris* (sous presse).
- [6] A. DELAUNAY et S. BAZIN. *Revue de Pathologie comparée* (sous presse).

# DÉGRADATION BACTÉRIENNE DES HYDROCARBURES PARAFFINIQUES

## I. — ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE SOUCHES MARINES ET TERRESTRES APPARTENANT AU GENRE *PSEUDOMONAS*

par MARIE KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER et J.-C. SENEZ (\*)

(*Centre National de la Recherche Scientifique,  
C. R. S. I. M., Marseille*)

L'existence de bactéries capables de dégrader les hydrocarbures est connue depuis Söhngen [12] qui, dès 1913, a isolé du sol 17 espèces différentes pouvant se développer en milieux où la seule source de carbone était constituée par du pétrole brut, de l'huile de vaseline, de l'éther de pétrole ou de la paraffine solide.

Par la suite, le recensement des espèces actives, leur distribution dans la nature, la variété des hydrocarbures métabolisés ont fait l'objet d'une abondante littérature, qui a été analysée de façon détaillée par Zobell [16], par Appert [4] et par Davis et Updegraff [4], ainsi que dans une monographie récente de Beerstecher [2].

Le présent travail concerne l'identification de plusieurs souches bactériennes isolées en vue de recherches ultérieures sur le métabolisme des hydrocarbures paraffiniques et ses mécanismes biochimiques.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° *Milieux de culture.* — Pour la culture des souches terrestres, non halophiles, on a employé un milieu minéral de base de composition analogue à celle qui a été utilisée par Imelick [7] dans ses études sur la dégradation du cyclohexane par les *Pseudomonas* :

CIN<sub>4</sub> : 0,5 g ; PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> : 0,5 g ; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K : 0,5 g ; SO<sub>4</sub>Mg 7 H<sub>2</sub>O : 0,5 g ; CNa : 4,0 g ; eau distillée : 1 l ; pH : 7,0.

Afin d'éviter leur précipitation au cours de la stérilisation, les phosphates sont stérilisés à part, dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée.

Dans le cas des souches marines, la quantité de CNa est portée à 20 g par litre et les sels sont dissous dans 900 cm<sup>3</sup> d'eau

(\*) Manuscrit reçu le 1<sup>er</sup> mars 1956.

distillée seulement. Le volume est complété au litre avec 100 cm<sup>3</sup> d'eau de mer naturelle, qui a été préalablement « vieillie » par deux ou trois semaines de conservation à l'obscurité [17].

Le pétrole brut (fuel), le *n*-heptane et le 2,2',4-triméthyl-pentane (« iso-octane ») nous ont été aimablement procurés par la raffinerie de Shell-Berre. Le *n*-pentane, le *n*-décane, le *n*-tétradécane et le *n*-hexadécane sont des produits Eastman-Kodak (« Practical Grade »). Le *n*-hexane et le cyclohexane sont des produits purs Prolabo. Ces hydrocarbures sont stérilisés en ampoules scellées sous vide, et ajoutés aseptiquement à la solution minérale, à la concentration uniforme de 1 p. 100. Les autres substrats carbonés ont également été incorporés au milieu de base à la concentration uniforme de 1 p. 100.

2° *Cultures primaires d'enrichissement.* — Les souches terrestres ont été isolées à partir d'échantillons de sol prélevés en un lieu qui était fortement pollué par le déversement industriel de produits pétroliers. La suspension obtenue par agitation prolongée de 1 g de terre dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée stérile a étéensemencée dans des ballons de 3 l, contenant 1 l de base minérale et 10 g de pétrole brut. Pour les souches marines, l'inoculum primaire a consisté dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau de mer prélevée en surface, au contact immédiat d'une nappe de mazout.

Les cultures ensemencées ont été incubées à 32°, sous barbotage continu d'un courant d'air stérile.

3° *Isolement des souches.* — Au bout d'une semaine environ, le développement des cultures primaires s'est manifesté par une modification du pétrole brut surnageant dont la coloration est devenue plus foncée, puis qui s'est rassemblé en gouttes volumineuses et a commencé à sédimenter au fond des ballons. On a procédé à un repiquage intermédiaire sur le même milieu, suivi d'un isolement des colonies sur milieu de base gélosé à 2 p. 100, la source de carbone étant constituée par de l'heptane. Etant donnée la volatilité de cet hydrocarbure, celui-ci n'a pas été incorporé dans la gélose, mais simplement déposé dans le couvercle des boîtes de Petri ensemencées et inversées.

Le processus d'isolement a été répété deux ou trois fois, jusqu'à ce que l'examen microscopique ait permis de conclure à la pureté des cultures. Finalement, on a ainsi obtenu 6 souches d'origine terrestre (S11, S14, S15, S16 et S20) et 5 souches d'origine marine (M10, M12, M13, M15 et M19). A partir de leur isolement, ces différentes souches ont été conservées en trois séries distinctes de subcultures sur pétrole brut, sur *n*-heptane et sur Bacto-Nutrient Broth (Difco), ceci afin de déterminer si les repiquages répétés en milieu habituel n'entraînent pas la perte de l'aptitude à utiliser les hydrocarbures.



## IDENTIFICATION DES SOUCHES.

Les principaux caractères relevés pour l'identification des souches sont rassemblés sur les tableaux I et II.

TABLEAU I. — Caractères généraux des souches.

	souches du sol			souches marines				
	S11, S14 S15, S16	S20	S19	M10	M12	M13	M15	M19
mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+
développement à 37°	+	+	+	+	+	+	+	+
développement à 42°	+	+	0	0	0	0	0	0
pigments produits	F.P.	F.P.	0	0	0	0	0	0
halophilie	fac.	fac.	fac.	str.	str.	fac.	fac.	fac.
gélatine	liq.	liq.	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.
lait	Pp.Al.	Pp.Al.	Al.	Ac.	Al.	Al.	N.	Al.
lait tournesolé	réd.	réd.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
nitrates	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>
indole	0	0	0	0	0	0	0	0

(F) : pigment fluorescent ; (P) : pyocyanine ; (fac.) : halophilie facultative ; (str.) : halophilie stricte ; (Pp.) : peptonisation ; (Al) : alcalinisation ; (Ac.) : acidification ; (N.) : réaction neutre ; (réd.) : réduction du tournesol ; (n. r.) : tournesol non réduit ; (N<sub>2</sub>) : nitrates réduits en azote gazeux ; (NO<sub>2</sub>) : nitrates réduits en nitrites.

1° *Souches isolées à partir du sol.* — Les cinq souches S11, S14, S15, S16 et S20 sont morphologiquement et biochimiquement très voisines. Ce sont des bacilles Gram négatifs, mesurant de 1,2 à 2  $\mu$  de long sur 0,6  $\mu$  de large, très mobiles, munis d'un flagelle polaire unique. Elles se développent activement à 37° et à 42°, produisent de la pyocyanine et un pigment soluble fluorescent, réduisent les nitrates en N<sub>2</sub>, peptonisent le lait et liquéfient la gélatine. Ces caractères sont identiques à ceux de *Pseudomonas aeruginosa* tels qu'ils sont décrits par Seleen et Stark [41] et dans le *Bergey's Manual* [3].

La souche S19 est également Gram négative, mobile et douée d'un cil polaire unique. Ses cellules sont cependant un peu plus larges (0,8  $\mu$ ) et atteignent fréquemment, même dans les cultures jeunes, en phase exponentielle de croissance, une longueur allant jusqu'à 11  $\mu$ . Elle ne produit pas de pigment, est incapable de se développer à 42°, ne liquéfie pas la gélatine et ne peptonise pas le lait. Les nitrates ne sont réduits qu'au stade nitrite, le glucose est acidifié et l'amidon n'est pas hydrolysé. Ces caractères sont conformes à ceux de *Ps. desmolyticum*, Gray et

Thornton, espèce rapportée comme étant capable de dégrader les hydrocarbures et notamment le naphthalène. Ils s'en distinguent toutefois en ce que l'organisme décrit par Gray et Thornton dégrade le phénol et ne se développe pas à 37°, mais ces deux différences ne paraissent pas avoir de valeur taxonomique.

TABLEAU II. — Développement des souches à partir de différents substrats organiques.

	souches du sol			souches marines				
	S11,S14 S15,S16	S20	S19	M10	M12	M13	M15	M19
<b>Sucres :</b>								
glucose	+++ A	+++ A	+++ A	++ N	++ N	++ N	+++ A	+ H
lactose	+ N	+++ N	+ N	+++ N	++ N	++ N	+++ N	++ N
saccharose	0	++	0	++ N	++ N	++ N	+++ N	++ N
glycérol	+++ A	+++ A	+++ A	+++ N	+ N	++ N	+++ A	++ N
<b>Acides-alcools :</b>								
lactate	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N
citrate	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+ N	+++ N	+++ N
<b>Acides gras :</b>								
acétate	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N	+++ N
n-propionate	+++ N	+++ N	+++ N	+++ (1)	+++ (1)	+++	+++	+++
iso-butyrate	+++ N	+++ N	+++ N	+++ (1)	+++ (1)	+++	+++	+++
n-butyrate	+++ N	+++ N	+++ N	+++	+++	+++	++	+++
n-oaprylate	+	+	0	0	0	0	+	0
ac.laurique	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ac.myristique	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
ac.palmitique	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ac.oléique	+++	+++	+++	0	0	0	0	0
ac.stéarique	+++	+++	+++					
<b>Détergents :</b>								
"Stergène"	+++	+++	+++					
"Aérosol OT"	+	+	+					

Le nombre de croix indique le degré macroscopique de développement des cultures ; (0) : pas de développement apparent ; (N) : milieu neutre ; (A) : milieu acidifié ; (1) : sur ces substrats, les deux souches M10 et M12 qui sont habituellement non-chromogènes, produisent de la pyocyanine.

2° *Souches d'origine marine.* — Les souches isolées à partir de l'eau de mer (M10, M12, M13, M15 et M19) sont des bacilles Gram négatifs, mobiles, de petite taille, mesurant de 1,1 à 3,0  $\mu$  sur 0,4 à 0,6  $\mu$ . Les nombreuses tentatives qui ont été faites pour colorer les cils de ces organismes par les techniques de Casarès-Gil, de Plimmer et Paine [10] et de Leifson [9], ont été infructueuses et, de ce fait, l'identification des souches marines n'est pas absolument concluante. Néanmoins, l'ensemble de leurs pro-

priétés conduit à considérer comme très vraisemblable que ce sont des *Pseudomonas*, appartenant au groupe des espèces qui ne liquéfient pas la gélatine et réduisent les nitrates en nitrites. A l'appui de cette interprétation, il convient de signaler que les deux souches M10 et M12, si elles ne sont pas chromogènes sur la plupart des milieux, forment cependant un pigment soluble, de coloration rose, dans leurs cultures sur *n*-propionate et sur iso-butyrate de soude.

Halophiles strictes, les souches M10 et M12 sont apparemment des espèces marines autochtones. Par contre, les trois autres souches sont halophiles facultatives et sans doute géogènes.

#### DÉVELOPPEMENT A PARTIR DES HYDROCARBURES.

Toutes les souches isolées se développent activement sur pétrole brut, *n*-heptane, *n*-décane, *n*-tétradécane et *n*-hexadécane, et les repiquages répétés en bouillon peptoné ne leur font pas perdre l'aptitude à utiliser ces substrats. A l'exception de M12 et M15, elles se développent également sur *n*-hexane. Le *n*-pentane n'est utilisé que par trois des souches marines (M10, M13 et M15). Le taux de croissance et le rendement cellulaire, à croissance totale, sont sensiblement plus faibles pour les cultures sur hydrocarbures paraffiniques que pour les cultures en milieux usuels. C'est ainsi que, pour la souche S20 qui est une des plus actives, les quantités de bactéries récoltées à partir de cultures sur Bacto-Nutrient Broth (Difco), sur acétate de soude à 1 p. 100 et sur *n*-heptane à 1 p. 100, sont respectivement de 217, 224 et 97 mg (poids sec) par litre.

En milieu liquide contenant du pétrole brut, les cinq souches de *Ps. aeruginosa* produisent de la pyocyanine et la coloration du milieu, d'abord vert émeraude, vire après quelques jours d'incubation, au rose saumon. Parallèlement, le pH s'abaisse de 7,0 à 5,5 environ. Ce virage de la pyocyanine aux pH acides a été signalé par Friedheim et Michaëlis [5].

Les souches étudiées sont incapables d'utiliser les cycloparaffines et aucune d'entre elles ne se développe sur cyclohexane, cyclohexène ou cyclohexanone. Par contre, les six souches du sol se développent sur ortho-, méta- et para-cyclohexane-diols, et la souche S19 pousse également sur cyclohexanol. Le 2,2',4-triméthyl-pentane n'est pas dégradé.

Le comportement à l'égard des hydrocarbures aromatiques polycycliques varie d'une souche à l'autre (tableau III), et il convient de souligner qu'aucune des onze souches n'utilise le benzène ni le phénol.

Le fait que nos souches personnelles appartiennent toutes au groupe des *Pseudomonas* est à rapprocher des constatations anté-

rieures de Haas [6]. Cet auteur a signalé que plus de 60 p. 100 des bactéries du sol capables de dégrader les hydrocarbures sont des membres de ce genre et que 95 p. 100 des souches pures de *Pseudomonas* conservées par l'American Type Culture Collection se développent sur kérosène. Parmi les 148 espèces de *Pseudomonas* décrites dans le *Bergey's Manual* [3], 12 sont indiquées comme étant capables d'utiliser pour leur croissance les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques.

TABEAU III. — Développement à partir des hydrocarbures et de certains de leurs dérivés.

	souches du sol			souches marines				
	S11,S14 S15,S16	S20	S19	M10	M12	M13	M15	M19
n-pentane	0	0	0	+++	0	+++	+++	0
n-hexane	+++	+++	+++	++	0	+++	0	++
n-heptane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
n-décane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
n-tétradécane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
n-hexadécane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2,2',4 triméthyl- pentane	0	0	0	0	0	0	0	0
cyclohexane	0	0	0	0	0	0	0	0
cyclohexène	0	0	0	0	0	0	0	0
cyclohexanol	0	0	+++	0	0	0	0	0
cyclohexane-1,2 diol	+++	+++	+++	0	0	0	0	0
cyclohexane-1,3 diol	++	+++	++	0	0	0	0	0
cyclohexane-1,4 diol	++	++	+	0	0	0	0	0
cyclohexanone	0	0	0	0	0	0	0	0
benzène	0	0	0	0	0	0	0	0
naphthalène	0	+++	+++	++	0	0	0	0
anthracène	0	++	++	0	0	0	0	0
phénanthrène	0	±	±	0	0	0	0	0
phénol	0	0	0	0	0	0	0	0

D'après les indications relevées dans la littérature, il ne semble pas qu'il existe une corrélation fixe entre le poids moléculaire des hydrocarbures aliphatiques et leur assimilabilité par les bactéries. Toutes nos souches attaquent les hydrocarbures de  $C_7$  à  $C_{16}$ , alors que plusieurs d'entre elles ne se développent pas sur n-pentane ou sur n-hexane. La souche de *Ps. fluorescens* étudiée par Johnson et coll. [8] n'utilise que les hydrocarbures dont la chaîne carbonée compte 16 atomes de carbone ou davantage, tandis que d'autres bactéries isolées par ces auteurs se déve-

loppent plus rapidement à partir des hydrocarbures compris entre  $C_6$  et  $C_9$  qu'à partir du dodécane.

Il ne semble pas non plus qu'on puisse tirer des conclusions générales en ce qui concerne les hydrocarbures à chaînes ramifiées. Les souches de Strawinski et Stone [14] et celles de Johnson et coll. [8] ont un comportement analogue aux nôtres et se développent à partir du *n*-octane, mais pas à partir du 2,2',4-triméthyl-pentane. Par contre, celles de Zobell [16] ont la particularité inverse.

Plusieurs des organismes isolés par Strawinski [13] ressemblent à nos souches S19, S20, M12 et M15 par leur propriété de pousser sur les hydrocarbures aromatiques tout en étant incapables d'utiliser le cyclohexane.

L'existence de bactéries dégradant les paraffines aliphatiques et n'utilisant pas les composés aromatiques a été signalée par Tausz et Peter [15]. L'organisme décrit par ces auteurs sous le nom de *Bacterium aliphaticum* est considéré par Haas [6] comme étant en fait un *Pseudomonas*, et serait donc très voisin de nos souches personnelles.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° On a isolé, à partir du sol et de l'eau de mer, onze souches pures de *Pseudomonas* capables d'utiliser comme seule source de carbone les paraffines aliphatiques de  $C_7$  à  $C_{16}$ .

2° Cinq de ces souches s'identifient avec *Ps. aeruginosa*, et une avec *Ps. desmolyticum* (Gray et Thornton).

3° Certaines seulement des souches isolées se développent à partir du *n*-pentane, du *n*-hexane, de l'anthracène ou du naphthalène.

4° Le 2,2',4-triméthyl-pentane (« iso-octane ») et le cyclohexane ne sont utilisés par aucun de ces organismes, dont plusieurs, par contre, peuvent utiliser les cyclohexane-diols.

#### SUMMARY.

Eleven pure strains of *Pseudomonas* able to use  $C_7$ - $C_{16}$  aliphatic paraffins as unique carbon source have been isolated from soil and sea water.

Five of these strains are identifiable with *Ps. aeruginosa* and one with *Ps. desmolyticum* (Gray and Thornton).

Only a few of them develop on *n*-pentane, *n*-hexane, anthracene and naphthalene.

None of the strains is able to use iso-octane or cyclohexane, but several can grow on cyclohexane diols.



BIBLIOGRAPHIE

- [1] APPERT (J.). *Rev. Inst. Franç. Pétrole*, 1952, **7**, 170.
- [2] BEERSTECHEER JR. (E.). *Petroleum Microbiology*. Elsevier, édit., New-York, 1954.
- [3] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6<sup>e</sup> édit., Williams et Wilkins, édit., Baltimore, 1948.
- [4] DAVIS (J. B.) et UPDEGRAFF (D. M.). *Bact. Rev.*, 1954, **18**, 238.
- [5] FRIEDHEIM (E.) et MICHAËLIS (L.). *J. biol. Chem.*, 1931, **91**, 355.
- [6] HAAS (H. F.). *Thesis*, Kansas State College, Manhattan, 1942.
- [7] IMELICK (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 922, 1227 et 2082.
- [8] JOHNSON (F. H.), GOODALE (W. T.) et TURKEVITCH (I.). *J. Cell. comp. Physiol.*, 1942, **13**, 163.
- [9] LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 377.
- [10] PLIMMER (H. C.) et PAINE (S. G.). *J. Path. Bact.*, 1921, **24**, 286.
- [11] SELEEN (W. A.) et STARK (C. N.). *J. Bact.*, 1943, **46**, 491.
- [12] SÖHNGEN (M. L.). *Centrabl. Bakt.*, II Abt., 1913, **38**, 621.
- [13] STRAWINSKI (R. J.). *Thesis*, Pennsylvania State College, 1943.
- [14] STRAWINSKI (R. J.) et STONE (R. W.). *J. Bact.*, 1940, **40**, 461.
- [15] TAUSZ (J.) et PETER (M.). *Centrabl. Bakt.*, II Abt., 1919, **49**, 497.
- [16] ZOBELL (C. E.). *Bact. Rev.*, 1946, **10**, 1.
- [17] ZOBELL (C. E.), GRANT (C. W.) et HAAS (H. F.). *Bull. Amer. Assoc. Petrol. Geol.*, 1943, **27**, 1175.

# RELATIONS IMMUNOLOGIQUES ENTRE *PASTEURELLA PESTIS* ET *PASTEURELLA* *PSEUDOTUBERCULOSIS*

par E. THAL (\*).

(*Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Stockholm*)

La pseudotuberculose, comme la peste à laquelle elle est apparentée, est une anthroponose. Alors qu'au cours des cinquante dernières années, aux Indes seulement, 12 millions et demi de personnes mouraient de peste [1], le nombre de cas de pseudotuberculose décrits chez l'homme est peu élevé et jusqu'à ce jour son agent étiologique n'a été isolé que dans 21 cas [2]. Parmi ceux-ci, 11 morts ; les 8 autres, tous diagnostiqués au cours des trois dernières années [3, 2], s'inscrivent comme des cas d'appendicite atypique à évolution bénigne. Depuis 1954, 30 cas environ, avec séro-agglutination positive vis-à-vis de *P. pseudotuberculosis*, ont été confirmés [4]. L'apparition de la pseudotuberculose chez de nombreuses espèces animales en Suède a mis à l'ordre du jour l'investigation des problèmes qui se rattachent à cette infection.

Mes recherches sur 200 souches environ de pseudotuberculose, provenant de différentes parties du globe, ont conduit à une différenciation sérologique en 5 groupes, dotés d'antigènes O indépendants [5, 6]. Certaines souches produisent une exotoxine contre laquelle il a été possible de déclencher une immunité active et passive [5, 7].

Dans les essais d'immunisation contre l'infection pseudotuberculeuse, il a pu être établi qu'une souche avirulente 32/IV, isolée d'un lièvre, pouvait conférer aux cobayes une immunité solide contre des souches de pseudotuberculose pourvues d'antigènes hétérologues O et H. Il a été possible de conclure que l'immunité en question était très probablement indépendante de ces deux antigènes. Avec un filtrat autolytique — et des sérums de souches R — on a pu mettre en évidence un élément sérologiquement commun, l'antigène R (1).

(\*) Manuscrit reçu le 8 février 1956.

(1) La technique de production des sérums R et autres sérums de lapin à usage diagnostique a été décrite précédemment [5].

J'ai supposé que l'antigène R, seul élément commun démontrable, était responsable de l'immunité [5]. De même une vieille souche de laboratoire dissociée, 74/R, injectée à une fréquence suffisante, a provoqué elle aussi l'immunité contre des souches pathogènes. Cette immunité semble être fonction du nombre des injections et de la dose totale d'antigène injectée [8].

Les recherches de Schütze avaient établi, que les réactions sérologiques croisées entre *P. pseudotuberculosis* et les sérums anti-pestueux dépendaient d'un antigène R commun [9]. Ce résultat sérologique n'avait pas été confirmé sur le plan théorique ni vérifié dans la pratique au point de vue immunologique. Schütze, avec d'autres chercheurs, estimait que la substance capsulaire des bacilles pesteux était le facteur immunologique le plus important [10] (2).

Si ma supposition concernant l'effet immunogénique de l'antigène commun R vis-à-vis de l'infection pseudotuberculeuse était correcte, une souche avirulente de pseudotuberculose pourrait protéger même contre l'infection pesteuse. J'ai eu l'occasion de faire ces expériences d'immunisation à la Fondation Hooper, Université de Californie, en collaboration avec Chen [11]. Les détails sont présentés dans les tableaux I et II.

Les expériences de protection montrent que la souche 32/IV de *P. pseudotuberculosis*, comme la souche pesteuse avirulente EV 76

TABLEAU I. — Expériences d'immunisation contre *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis* (cobayes).

Immunisés avec	Infectés par	
	<i>P. pestis</i> 195/P	<i>P. pseudotub.</i> 14/1
<i>P. pestis</i> E.V. 76 (bacilles vivants)	10/10	2/10
<i>P. pseudotuberculosis</i> 32/IV (bacilles vivants)	10/10	9/10
Témoins	0/10	0/10

(2/10 = 2 cobayes survivants sur 10 infectés). — Immunisation avec *P. pestis* E. V. 76 : 55 millions de bacilles. *P. pseudotuberculosis* 32/IV : 139 millions de bacilles. — Infection i. p. trois semaines plus tard : *P. pestis* 195/P : 760 000 bacilles. *P. pseudotuberculosis* 14/1 : 45 millions de bacilles.

(2) Pour ce qui concerne les travaux expérimentaux sur l'immunité croisée entre les deux espèces microbiennes, et notamment ceux de S. Rowland, de A. Boquet et de E. Dujardin-Beaumetz, le lecteur se reportera au *Manual of Plague* de Wu-Lien Teh et coll., 1 vol., 547 p. National Quarantine Service, Shanghai Station, Chine (1936), p. 129-130, où il trouvera toutes références utiles.

TABLEAU II. — Expériences d'immunisation contre *P. pestis* (cobayes).

<i>P. pseudotub.</i> 32/IV (tués avec chloroforme 1%)	<i>P. pseudotub.</i> 74 R (vivants)	<i>P. pestis</i> TRU (vivants)	Témoins
I	II	III	
3/10	10/10	1/10	0/8

*Immunisation* : Les cobayes ont reçu  $6 \times 0,5$  ml i. p. de : I. *P. pseudotub.* 32/IV : 1 000 mill.  $\times 6 = 6$  000 mill. bacilles tués. — II. *P. pseudotub.* 74/R : 343 mill.  $\times 6 = 1$  020 mill. bacilles vivants. — III. *P. pestis* TRU : 1 455 mill.  $\times 6 = 4$  400 mill. bacilles vivants. — *Infection* i. p. trois semaines plus tard : *P. pestis* 195/P : 585 000 bacilles.

(Girard), est capable de protéger contre des doses d'épreuve massives de *P. pestis*. Même *Pasteurella pseudotuberculosis* 74/R, injectée six fois, a conféré une immunité solide contre la peste. La parenté sérologique trouve ainsi sa contre-partie immunologique.

Les relations sérologiques entre *Pasteurella pestis* (3), *Pasteurella pseudotuberculosis* et *Salmonella* sont consignées dans le tableau III. Les anti-sérums obtenus avec les bacilles pseudotuberculeux à la phase sérologique S (sérums O—, OH) ne donnent pas de réaction croisée avec les bacilles pesteux [42]. Les sérums pseudotuberculeux R, toutefois, réagissent spécifiquement avec les souches avirulentes de peste utilisées. La souche virulente de peste employée n'a pas réagi au sérum homologue somatique ni aux sérums pseudotuberculeux R, ce qui pourrait s'expliquer par la présence dans ces souches d'un antigène Vi, ainsi que le donnent à penser plusieurs travaux [43].

La technique de préparation de l'extrait pour l'épreuve de précipitation [5] révèle que le composant sérologique commun à *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis* se dissout rapidement en solution saline. Baker et coll. ont extrait de *P. pestis* deux fractions hydrosolubles. D'après ces auteurs, la fraction I A consiste principalement en une protéine associée à un polyside, représentant la substance capsulaire, tandis que la fraction I B est une protéine pure. La fraction II représente la toxine pesteuse. Aucune différence appréciable dans le pouvoir immunologique des fractions I A et I B n'a pu être trouvée par Baker et coll. et les fractions I A et I B semblent être sérologiquement identiques [45]. Mes recherches montrent que la fraction I A n'est pas sérolo-

(3) Les souches typiques de peste et les sérums ont été aimablement mis à ma disposition par le Dr F. Meyer, de San Francisco.





giquement identique à la fraction I B. La fraction I B est formée d'au moins deux éléments, dont l'un peut être mis en évidence chez tous les bacilles pseudotuberculeux, souches des 5 groupes, toxiques (souche 43/III) ou atoxiques (souche 27/III).

La fraction IB du sérum peut être dégagée de cet élément par l'absorption avec des bacilles pseudotuberculeux ou des souches de peste dépourvues de capsule.

Comme on le verra dans le tableau IV, la fraction I B du sérum pesteux après absorption ne réagit ni avec *P. pseudotuberculosis*, ni avec les bacilles pesteux sans capsule. Seul *P. pestis*, dont l'antigène capsulaire excède un certain minimum [16], a donné des réactions positives avec les sérums absorbés. C'est pourquoi l'autre composant de la fraction I B semble réagir sérologiquement de la même manière que la fraction I A (tableau III).

TABLEAU IV. — Réaction des précipitines avec anti-sérum Fraction IB (*P. pestis* 195/P) après saturations.

Sérum	Saturé	E x t r a i t										
		<i>Pasteurella pestis</i>					<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i>					
		Yrøke (vir)	All22	E.V.76	14	TRU	14/I	16/II	27/III	43/III	25/V	74/R
Fraction IB	<i>Salmonella cholerae suis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Pasteurella pestis</i> TRU	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pasteurella pseudotub.</i> 74/R	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

D'après Meyer et ses collaborateurs, la valeur d'un vaccin anti-pesteux dépend de la fraction I B qu'il contient [13]. Seal [17] a démontré l'existence d'une fraction immunochimique commune à *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis*, mais il n'y a attaché aucun pouvoir protecteur.

Les expériences d'immunisation, ainsi que les constatations sérologiques présentées, suggèrent de façon péremptoire que la parenté entre les deux espèces tient au facteur immunochimiquement commun, responsable de l'immunité provoquée.

#### RÉSUMÉ.

1° *P. Pestis* et *P. pseudotuberculosis* ont des réactions sérologiques croisées avec les sérums R, mais pas avec les sérums OH ou O. L'antigène commun R est soluble dans l'eau. Il semble que les souches de peste virulentes possèdent un antigène Vi.

2° Les souches pseudotuberculeuses avirulentes confèrent une protection absolue contre des doses massives de *P. pestis*. La parenté sérologique entre *P. pseudotuberculosis* et *P. pestis* (antigène R) a sa contrepartie immunologique.

3° La fraction I B de *P. pestis* hydro-soluble (Baker et coll.) renferme un facteur commun à *P. pseudotuberculosis* (souches du groupe I-V). Cet élément peut être éliminé du sérum fraction I B, soit par absorption par les bacilles pseudotuberculeux, soit par des souches R de *P. pestis*.

4° Pour l'auteur, le facteur immunochimiquement commun serait responsable de la production de l'immunité.

#### SUMMARY.

1° *Pasteurella pestis* bacteria crossreact serologically with *Pasteurella pseudotuberculosis* R-sera but not with OH— or O-sera. The common R-antigen is soluble in water. Virulent plague strains seem to possess a Vi-antigen.

2° Avirulent pseudotuberculosis strains gave full protection against massive doses of *Pasteurella pestis*. The serological relationship between *Pasteurella pseudotuberculosis* and *Pasteurella pestis* (R-antigen) has its immunological counterpart.

3° The water-soluble fraction I B of *Pasteurella pestis* (Baker et al.) contains a component common with *Pasteurella pseudotuberculosis* (strains of V groupes). This component can be eliminated from fraction I B serum either by absorption with *Pasteurella pseudotuberculosis* bacteria or *Pasteurella pestis* R-strains.

4° It is suggested that the immunochemically common factor is responsible for the immunity induced.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. POLLITZER. *Plague. Monograph n° 22. O. M. S.*, 1954.
- [2] W. KNAPP. (Sous presse.)
- [3] M. PIÉCHAUD. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 420.
- [4] W. KNAPP. *Der Chirurg*, 1955, **26**, 440.
- [5] E. THAL. *Untersuchungen über Pasteurella pseudotuberculosis*. Thèse. Lund, Suède, 1954. Résumé anglais in *Nord. Vet.-Med.*, 1954.
- [6] G. GIRARD et A. CHEVALIER. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 227.
- [7] M. SCHAR et E. THAL. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1955, **88**, 39.
- [8] E. THAL. (Résultats non publiés.)
- [9] H. SCHÜTZE. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 284.
- [10] H. SCHÜTZE. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 235.

- [11] E. THAL. *Nord. Vet.-Med.*, 1955, **7**, 151.
- [12] S. S. BHATNAGAR. *Indian J. med. Res.*, 1940, **28**, 1.
- [13] In G. GIRARD. *Ann. Rev. Microb.*, 1955, **9**, 253.
- [14] W. KNAPP. *Z. Bakt. Orig. I.*, 1955, **164**, 57.
- [15] E. BAKER, H. SOMMER, L. E. FOSTER, E. MEYER et K. F. MEYER.  
*J. Immunol.*, 1952, **68**, 131.
- [16] E. ENGLESBERG, T. H. CHEN, J. B. LEVY, L. E. FOSTER et K. F. MEYER.  
*Science*, 1954, **110**, 413.
- [17] S. C. SEAL. *Ann. Biochem. exp. Med.*, 1951, **11**, 171.

# **DOSAGE DE L'ANTIGÈNE O** **AU COURS DE LA CONSERVATION** **DE QUELQUES SOUCHES DE *S. TYPHI*** **EN DIVERS MILIEUX**

par R. COMBES, A.-M. STAUB et L. LE MINOR (\*)

(*Institut Pasteur. Service des Vaccins*)

Il est habituel de conserver les souches des Salmonelles par l'un des moyens suivants : repiquage sur milieu à l'œuf, milieu de Kauffmann ou gélose nutritive, ou lyophilisation.

Ayant mis au point une technique de dosage immunochimique de l'antigène O dans les germes de *S. typhi* [2, 3], nous nous sommes proposé de suivre la conservation de cet antigène dans les germes lyophilisés ou conservés sur ces divers milieux. Cette conservation peut avoir, en effet, une certaine importance, en particulier pour les souches destinées à entrer dans la composition d'un vaccin anti-typhoïdique.

## **MATÉRIEL ET TECHNIQUE.**

**SOUCHES DE « *S. TYPHI* ».** — Les quatre souches utilisées, T37.51, T38.51, T52.1272 et T52.1283, furent isolées d'hémocultures. Elles avaient subi quelques repiquages au laboratoire lorsque débuta cette étude en janvier 1953. Ces quatre souches contiennent les antigènes O, H et Vi.

**MILIEUX DE CONSERVATION** [4]. a) — *OEuf coagulé*. Un mélange constitué de trois parties d'œuf complet bien battu et d'une partie de solution physiologique, est chauffé, dans des tubes inclinés, deux fois à 85°, ce qui assure la coagulation et la stérilité du milieu.

On ensemeince le tube au moyen d'une culture en bouillon. Après séjour de vingt-quatre heures à 37°, on remplace le coton par un bouchon de caoutchouc et l'on conserve à + 4°.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 février 1956.

b) *Milieu de Kauffmann.* — Ce milieu est constitué par le mélange suivant :

Extrait Liebig .....	5 g
Peptone .....	3 g
ClNa .....	3 g
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ (12 $\text{H}_2\text{O}$ ) .....	2 g
Gélose .....	10 g
E. D. .... Q. S. pour	1 000 $\text{cm}^3$

On répartit le milieu liquide dans des tubes de petit diamètre (0,5 cm) sur 2 cm environ de hauteur. Après stérilisation on ensemente le culot par piqûre. Après séjour de vingt-quatre heures à 37°, on conserve à la température du laboratoire.

c) *Gélose nutritive inclinée.* — Il s'agit d'un bouillon de viande ordinaire peptoné (1 p. 100) et salé (0,5 p. 100), additionné de 3 p. 100 de gélose. La surface estensemée avec une culture en bouillon. Après vingt-quatre heures à 37° on conserve le tube capuchonné à la température du laboratoire.

LYOPHILISATION. — Des bacilles cultivés dix-huit heures sur gélose nutritive sont mis en suspension dans du bouillon additionné d'ascite (33 p. 100) à raison de 5 milliards environ par centimètre cube. On lyophilise cette suspension répartie sous le volume de 0,1  $\text{cm}^3$  dans des ampoules qui sont ensuite scellées sous vide et conservées à + 4°.

DOSAGE DU POLYOSIDE. — Nous donnerons intégralement la technique exacte que nous avons suivie au cours de cette étude. C'est la technique décrite dans notre premier mémoire [2], modifiée dans le sens des observations rapportées dans notre deuxième mémoire [3].

On récolte dans 50  $\text{cm}^3$  de solution physiologique (NaCl, 0,9 p. 100) les germes cultivés pendant dix-huit heures (1) sur la gélose nutritive de deux boîtes de Roux. On précipite par deux volumes d'alcool absolu cette suspension, contenant environ 50 milliards de germes par centimètre cube. Après quelques heures à la température du laboratoire et centrifugation, le précipité est repris par 30  $\text{cm}^3$  d'eau distillée et précipité une deuxième fois. Ce deuxième précipité est mis en suspension dans 40  $\text{cm}^3$  d'eau distillée. 10  $\text{cm}^3$  serviront pour les dosages d'azote et éventuellement des déterminations des poids secs, tandis qu'on ajoute 7,5  $\text{cm}^3$  d'acide acétique normal aux 30  $\text{cm}^3$  restant pour effectuer la première hydrolyse. Après deux heures au bain-marie bouillant, on centrifuge : les germes sont hydrolysés une

(1) L'expérience nous a montré que le taux de polyoside des germes atteignait son maximum entre huit et dix-huit heures.



deuxième fois dans les mêmes conditions, puis les deux hydrolysats limpides sont mélangés et neutralisés avec de la soude normale. Après élimination du précipité qui se forme, on précipite par 9 volumes d'alcool absolu. Après quinze heures à la température du laboratoire on centrifuge ; le précipité, repris par 30 cm<sup>3</sup> d'eau distillée, est centrifugé pour éliminer l'insoluble et précipité une deuxième fois par 9 volumes d'alcool. Ce précipité est lavé par l'alcool et desséché sous vide sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Il sera repris dans 30 cm<sup>3</sup> de solution physiologique et fournira l'extrait dont la teneur en polyoside sera déterminée par le dosage immunochimique [2].

### RÉSULTATS.

Nous avons effectué 21 dosages échelonnés sur trente-trois mois avec chacune des quatre souches. Le résultat de ces dosages est exprimé par le rapport  $\frac{\text{Polyoside}}{\text{Azote}}$  (P/N). Il pourrait sembler plus logique de l'exprimer par le pourcentage de polyoside dans

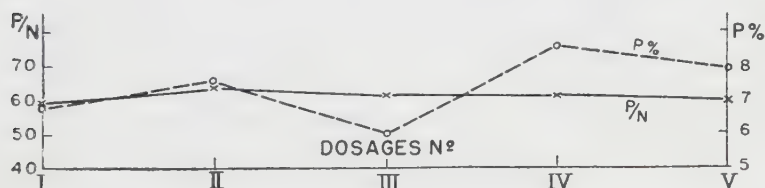


FIG. 1. — Comparaison entre les données fournies pour les mêmes dosages par les rapports P/N et P p. 100.

le poids sec des germes ; mais l'expérience nous a montré que premier rapport fournissait des résultats plus constants.

Nous avons schématisé sur la figure 1 les résultats obtenus au cours des cinq dosages de la souche T 52.1272 conservée sur milieu à l'œuf. On voit que si le rapport P/N conserve des valeurs oscillant entre 0,59 et 0,64, le rapport P p. 100 varie de 5,0 à 7,6. Ceci est inhérent à la technique utilisée pour notre dosage. En effet nous avons dû supprimer le lavage des germes qui éliminait une partie de l'antigène somatique [3] (2). La pré-

(2) Nous avons vérifié que des germes jeunes (quatre heures de culture en gélose) ne perdaient pas d'antigène au cours des lavages, la perte est faible après huit heures de culture, et considérable après dix-huit heures. Ceci appuie l'hypothèse émise dans notre deuxième mémoire [3], à savoir : l'antigène perdu au cours des lavages est libéré par des germes sénescents plus facilement lysables que d'autres.

cipitation de ces germes par l'alcool peut alors entraîner quelques substances immunologiquement inertes dont la teneur en azote est faible ou nulle, mais qui peuvent intervenir dans l'évaluation du poids sec. Tous nos résultats seront donc exprimés, pour faciliter la lecture, par le rapport P/N multiplié par 100.

Le premier dosage effectué sur chaque souche avant la répartition sur les quatre milieux de conservation nous a donné les valeurs rapportées sur le tableau I (janvier 1953). On voit qu'il s'agit de souches riches en polyoside (P/N oscillant entre 59 et 67) les souches pauvres pouvant donner, pour le même rapport P/N, des valeurs descendant au-dessous de 30 [2] (3).

TABLEAU I. — Dosage du polyoside somatique avant et après conservation pendant trente-trois mois sur divers milieux.

Souches	T <sub>52.1283</sub>	T <sub>52.1272</sub>	T <sub>38.51</sub>	T <sub>37.51</sub>
Janvier 1953	64*	59	68	67
Octobre 1955				
Milieu à l'œuf	70	60	75	75
Lyophilisation	71	70	81	82
Milieu Kauffmann	67	62	62	65
Gélose nutritive	57	44	57	53

\* Rapport  $\frac{\text{Azote}}{\text{Polyoside}}$  (P/N) multiplié par 100.

Le deuxième dosage, effectué après quatre mois de conservation, a donné les résultats figurant dans le tableau II. L'incohérence des chiffres trouvés, en particulier les valeurs très faibles obtenues par les souches T 37.51 et T 52.1283 conservées sur œuf, nous ont amenés à soupçonner le rôle du milieu de culture sur l'élaboration de l'antigène.

(3) Ces différences entre les souches riches et pauvres en polyoside, que nous avons soulignées antérieurement, et qui tiennent à l'état de dissociation  $S \rightarrow R$  des souches, expliquent la différence entre nos résultats et ceux de Webster et coll. [4] sur la souche T O 901. Ces auteurs trouvent 6,2 p. 100 de polyoside, valeur inférieure à la moyenne de 7,5 trouvée, par exemple, pour la souche T 52.1272 conservée sur le milieu à l'œuf (fig. 1). Ils comparent cette valeur à celle que nous avons donnée dans notre premier mémoire (3,3 p. 100) ; or notre souche T O 901 avait, à cette époque, tendance à devenir R et était donc pauvre en polyoside. De plus, nous effectuons alors le dosage après lavage des germes, ce qui nous faisait perdre une partie de l'antigène, comme nous l'avons montré dans notre deuxième mémoire [3].

TABLEAU II. — Dosages effectués après culture des germes sur des bouillons différents.

Milieu de conservation	S O U C H E S			
	T <sub>52.1283</sub>	T <sub>52.1272</sub>	T <sub>38.51</sub>	T <sub>37.51</sub>
Lyophilisation	72	73	71	77
Oeuf	53	61	69	44
Milieu Kauffmann	/	/	78	88
Gélose ordinaire	/	/	68	83

Afin de pouvoir faire une étude comparative, nous avons conservé un stock de bouillon de culture en flacons à cols scellés : toutes les cultures ayant servi aux dosages ultérieurs ont été faites avec ce même bouillon.

Les autres dosages ont été effectués après environ dix mois, dix-huit mois, vingt-deux mois et trente-trois mois de conservation.

Les résultats du dernier dosage figurent sur le tableau I avec ceux du dosage initial. On remarque que, pour les germes lyophilisés ou conservés sur milieu à l'œuf, la teneur en polyside semble supérieure à celle des germes initiaux. Ceci est dû au changement de bouillon utilisé pour la culture, comme nous venons de l'expliquer. En comparant entre eux les chiffres fournis par le dernier dosage, on peut dire que, par ordre de valeur croissante, les techniques utilisées se classent dans l'ordre suivant : gélose ordinaire, milieu de Kauffmann, milieu à l'œuf, lyophilisation. Si on considère les graphiques de la figure 2, on retrouve bien la nette infériorité de la gélose ordinaire et du milieu de Kauffmann (tout au moins pour trois des souches étudiées). Par contre, le milieu à l'œuf semble un aussi bon moyen de conservation que la lyophilisation dont les résultats sont inconstants (peut-être cela est-il dû à notre mode de lyophilisation, quelques ampoules ayant pu être desséchées dans des conditions défectueuses).

La constance des résultats obtenus avec les souches conservées sur l'œuf est très satisfaisante puisque sur les 16 dosages effectués avec le même bouillon, un seul (souche T 38.51, après dix mois) s'écarte de plus de 5 p. 100 de la moyenne des quatre dosages effectués sur une même souche.

L'infériorité du milieu de Kauffmann et de la gélose ordinaire peut se constater dès huit mois de conservation. On pourrait s'étonner alors que la teneur en polyside ne continue pas à baisser. En réalité, ceci tient au fait qu'avant d'ensemencer les boîtes de Roux dont la récolte servait au dosage, nous avons

toujours « entraîné » nos germes par deux cultures, en bouillon et sur gélose, et sélectionné, par isolement sur gélose, les colonies les plus « smooth ». En réalité, au cours de la conservation sur ces deux milieux, les colonies en voie de dissociation se montrent de plus en plus nombreuses, tant dans le sens  $S \rightarrow R$

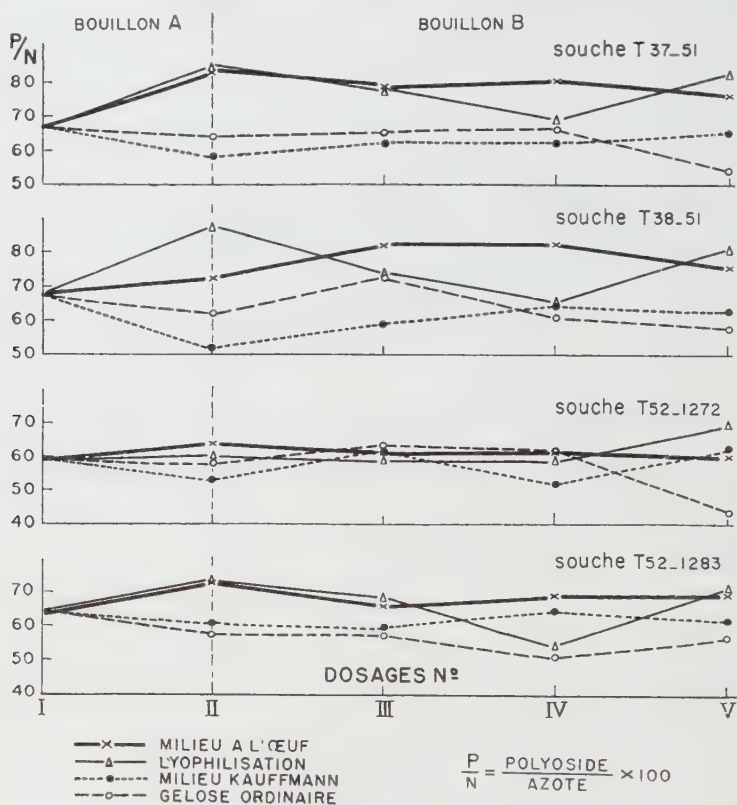


FIG. 2. — Conservation de 4 souches de *S. typhi* après lyophilisation ou ensemencement sur divers milieux.

que dans le sens d'une modification  $V \rightarrow W$ , ce qui suggère que les deux milieux ne sont pas plus favorables à la conservation de l'antigène Vi qu'à celle de l'antigène O.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Le milieu à l'œuf semble indiqué pour conserver des souches de *S. typhi* V à  $+4^{\circ}$ . Après trente-trois mois sans repiquage,

les germes obtenus après entraînement de ces souches avaient conservé tous les caractères des germes de départ : smooth, V, richesse en polyside O, dont le taux reste remarquablement constant.

La lyophilisation donne des résultats très semblables à ce moyen de conservation.

La gélose nutritive inclinée et le milieu de Kauffmann ont donné des résultats moins satisfaisants.

#### SUMMARY.

The egg medium appears to be a suitable medium for the conservation of *S. typhi* V strains at 4° C. After 33 months without reseedling, the bacteria obtained by culture of these strains had conserved all the characteristics of the original cultures : smooth V, high polyside O content, the titre of which remains remarkably constant.

Lyophilisation yields results which are very similar to this method of conservation.

Kauffmann's medium and inclined tubes of nutritive agar slants have given less satisfactory results.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. KAUFFMANN. *Enterobacteriaceae*, Munksgaard, édit. Copenhague, 1954.
- [2] A. M. STAUB et R. COMBES. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 21.
- [3] A. M. STAUB et R. COMBES, *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 528.
- [4] M. E. WEBSTER, J. F. SAGIN, M. LANDY et A. G. JOHNSON. *J. Immunol.*, 1955, **74**, 455.



## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PYOCINES

par Y. HAMON (\*)

(Institut Pasteur. Service des Bactériophages)

Jacob a isolé et étudié, le premier, une substance antibiotique élaborée par une souche de *Pseudomonas pyocyanea* d'origine anglaise ; cette substance, appelée pyocine, se rapproche des colicines ; comme les cultures lysogènes et colicinogènes, sa biosynthèse peut être induite par exposition de cette culture aux U.V. et aux agents mutagènes [1].

Nous nous sommes demandé si la souche pyocinogène C10 de Jacob constituait un échantillon antibiotique exceptionnel dans l'espèce ou, au contraire, s'il ne serait pas possible d'isoler d'autres souches antibiotiques de *Pseudomonas pyocyanea*.

### RECHERCHES DE NOUVELLES SOUCHES ANTIBIOTIQUES DE *Ps. pyocyanea*.

Nous avons étudié 8 souches anglaises de même provenance que la souche pyocinogène C10 : souches C1, C2, C3, C4, C5, C6, C10 et C15 (1), et 8 souches françaises provenant de la collection du Service des Bactériophages de l'Institut Pasteur : souches P3, P4, P5, P6, P7, P9, P10, P11.

Les pyocines sont parfois retenues par les bougies de porcelaine L3 ; en outre, l'addition d'antiseptique ( $\text{CHCl}_3$ ) pour stériliser les cultures donne, aux faibles dilutions, une zone d'inhibition qui masque une activité antibiotique éventuelle. C'est pourquoi nous avons adopté la technique suivante, qui s'inspire de la méthode en triple couche employée par Fredericq [2] pour ses expériences de transfert de propriétés colicinogènes.

Un  $\text{cm}^3$  de différentes dilutions ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) des cultures en bouillon des 16 échantillons étudiés est mélangé à 1  $\text{cm}^3$  de gélose en surfusion à  $50^\circ \text{C}$  ; le mélange est versé à la surface d'une plaque de gélose nutritive ordinaire (gélose à la peptone Vaillant 5B). Lorsque cette deuxième couche est solidifiée, on verse à sa surface une troisième couche de 10  $\text{cm}^3$  de gélose

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 1<sup>er</sup> mars 1956.

(1) Nous remercions le Dr Dickinson qui nous a obligeamment envoyé ces échantillons.

à la peptone Vaillant et on porte les boîtes de Petri à l'étuve à 37° C. Après quarante-huit heures d'étuve, les colonies bactériennes se développent dans l'épaisseur de la gélose et élaborent éventuellement la substance antibiotique recherchée que l'on met alors en évidence en étalant à la surface de la troisième couche la souche révélatrice P10. Après une nuit à 37°, une souche antibiotique donne dans la couche P10 des auréoles d'inhibition centrées chacune par une colonie sous-jacente.

Les auréoles ainsi obtenues, généralement très nettes, ont un diamètre variable suivant les souches envisagées et les clones d'une même souche. Toutes les colonies d'une souche antibiotique donnent des auréoles, ce qui fait penser que chaque bactérie de ces cultures est capable de transmettre le caractère antibiotique. Nous n'avons pas réussi à obtenir la régénération du principe inhibiteur sur P10 par raclage du bord des auréoles et transfert dans un milieu neuf adéquat de la petite quantité de culture P10 ainsi prélevée. Il en est de même lorsqu'on emploie comme souche révélatrice C15 ou C10. On ne se trouve donc pas en présence de principes transmissibles, mais d'une substance létale du groupe de la pyocine C10. Nous avons pu ainsi établir que les 11 souches suivantes élaborent des pyocines : C1, C2, C3, C4, C5, C6, C10, P3, P4, P6, P7, en ne nous servant que d'un nombre limité de souches révélatrices. Nous nous sommes alors attaché à étudier les propriétés particulières de chacune de ces préparations, de façon à en dégager les propriétés générales ; nous n'avons pas repris l'étude de la pyocine C10, ce travail ayant été déjà réalisé par Jacob [4].

#### PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES PYOCINES ÉTUDIÉES.

Les pyocines sont élaborées pendant la croissance de *Pseudomonas pyocyanea* en quantités variables selon les souches. Une exposition convenable aux U.V. des cultures C5 et C10 en phase de croissance exponentielle provoque l'induction de la propriété pyocinogène à l'ensemble de ces populations : après une phase de croissance résiduelle d'une heure trente, les cultures se lysent et libèrent à ce moment une quantité importante d'antibiotique.

Il nous paraît opportun de signaler ici la sensibilité extraordinaire de la souche C10 aux U.V., comme Jacob [4] l'avait souligné. Les bacilles pyocyaniques étant généralement plus sensibles que les colibacilles, la souche C10 est environ cinq fois plus sensible que les autres souches de l'espèce (2). Pour provo-

(2) Nous utilisons une lampe à vapeur de mercure à haute tension et basse pression, libérant à une distance de 50 cm une énergie de 4 000 ergs/mm<sup>2</sup>/min. pour la radiation principale de 2 537 Å.

quer le choc inducteur, il suffit d'une irradiation d'une durée de vingt à trente secondes pour C10 en eau peptonée, tandis qu'il convient d'irradier la souche C5 pendant une minute trente secondes ou deux minutes. Une irradiation pendant deux minutes de la souche C10 inactive totalement la population en phase de croissance exponentielle. Remarquons que les mutants R de C10 convenablement irradiés sont induits à produire une quantité considérable de pyocine, sans qu'on puisse observer la lyse massive de la culture, ni même une lyse décelable. Ce comportement de la variante R de C10 rappelle alors celui d'une culture colicinogène inductible (Fredericq [3], Hamon [4]).

Notons que la plupart des souches étudiées ici se sont révélées lysogènes, ce qui pourrait expliquer la lyse de leurs cultures après le choc inducteur. Dans la majorité des cas, l'activité antibiotique des pyocines a gêné la recherche des bactériophages de lysogénéité ; néanmoins, l'emploi d'un agent physique (chaleur) ou biologique (sérum neutralisant l'antibiotique, action des protéases) a permis d'atteindre notre but et de confirmer l'opinion selon laquelle la lysogénéité est très fréquente dans l'espèce (Conge [5], Warner [6]).

Quel est le mode d'action de ces diverses préparations sur les bactéries sensibles ? Nous avons déjà mentionné que les principes étudiés n'étaient pas transmissibles ; ils exercent donc une activité létale et l'on n'observe jamais aux dilutions limites de formation de plages typiques semblables à celles des bactériophages, lors des titrages sur milieux solides. En milieu liquide, l'addition à une culture en phase de croissance exponentielle d'une forte quantité de pyocine, arrête après un délai de quelques minutes (temps moyen de fixation sur l'ensemble des cellules) le processus de croissance ; si l'on dilue la culture, la croissance ne reprend pas dans les heures qui suivent. Il s'agit donc d'un principe exerçant une action létale et non bactériostatique.

Quelle est la structure de ces substances ? Des cultures de *Ps. pyocyanea*, souche P10, ont été additionnées de diverses concentrations des différents filtrats antibiotiques. Nous avons ainsi obtenu des courbes de survie des germes. Nous donnons ci-contre (fig. 1) les courbes relatives à l'activité des pyocines P3 et C5, tous les autres filtrats étudiés donnant des courbes du même type (coordonnées semi-logarithmiques). L'examen de ces courbes permet d'affirmer que les substances envisagées exercent une action bactéricide et possèdent une structure particulière, puisqu'il est possible d'obtenir, pour chaque concentration d'antibiotique, en réglant le temps de contact, des taux de survie intéressant une fraction importante de la population microbienne. D'autre part, les mêmes courbes présenteraient, dans leur portion initiale, une allure exponentielle en coordonnées normales, ce

qui donne à penser qu'un seul événement est responsable de la mort de chaque cellule.

Sur quelles espèces agissent les pyocines ? Elles sont actives, en premier lieu, sur de nombreuses souches de *Ps. pyocyanea*. L'inhibition observée est presque totale (de rares mutants échappent généralement à l'activité létale de ces substances). Nous avons recherché l'action des pyocines sur quelques espèces de la famille des Entérobactériacées : les *Salmonella* (*S. typhi*, *S. paratyphi* B), les *Shigella* et les *Proteus*, dans leur forme « smooth », sont généralement résistantes aux pyocines. La

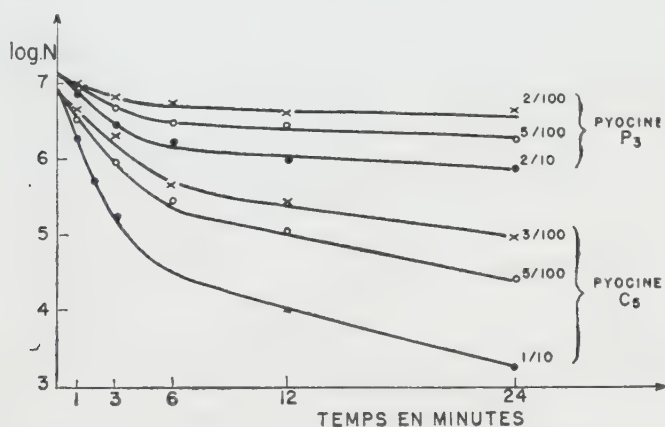


FIG. 1. — Courbe de survie des bactéries *Ps. pyocyanea* souche P10 exposées à des dilutions variables de pyocines P3 et C5. A 0,9 cm<sup>3</sup> d'une suspension de la souche P10 contenant 8.10<sup>6</sup> bactéries dans 0,1 cm<sup>3</sup> (courbes de C5) et 12.10<sup>6</sup> bactéries dans 0,1 cm<sup>3</sup> (courbes de P3), on ajoute 0,1 cm<sup>3</sup> des dilutions des pyocines étudiées. Après une, trois, six, douze, vingt-quatre minutes, on prélève des échantillons du mélange et l'on recherche le nombre de bactéries survivantes. En ordonnées sont portés les logarithmes décimaux du nombre de bactéries capables de former des colonies ; en abscisses, le temps en minutes.

recherche de l'action de 6 de ces pyocines (C1, C3, C4, C5, C6 et P6) sur 80 souches d'*E. coli* de gastro-entérite infantile appartenant à des types sérologiques et bactériophagiques différents [7] montre que cette espèce n'est généralement pas sensible aux antibiotiques de *Ps. pyocyanea* (cependant la pyocine C5 agit sur un nombre assez important de souches d'*E. coli* 111:B4, 55:B5 et 25:B6 de types bactériophagiques divers). Si les Entérobactériacées sous leur forme S résistent généralement aux pyocines, les variantes R de ces différentes souches, au contraire, sont très sensibles. Ceci rejoint les constatations que nous avons faites



concernant l'action des colicines sur les bactéries rough [4]. Il faut donc admettre que la cause de cette résistance réside dans la présence d'antigènes de surface qui empêchent l'antibiotique de s'unir à son « récepteur ».

Les souches révélatrices particulièrement sensibles à la plupart des colicines, *E. coli* souche B, *E. coli* souche K12 non lysogène, *E. coli* souche n° 36, *Sh. paradysenteriae* Y6R, sont généralement insensibles à l'action des pyocines ; néanmoins, dans certains cas exceptionnels, on observe une inhibition voilée peu nette sur Y6R.

Inversement, les colicines ne sont pas actives à l'égard des *Pseudomonas*.

Les pyocines, substances protéiques, sont-elles antigéniques ? Les essais infructueux de Gratia [8] et Fredericq [9] pour obtenir des sérums neutralisant les colicines nous ont incité à reprendre l'étude de ce problème. Les résultats actuels de nos expériences permettent d'affirmer que les pyocines, comme les colicines, provoquent la formation d'anticorps neutralisants et précipitants, lorsqu'elle sont injectées aux lapins [10].

#### PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PYOCINES ÉTUDIÉES.

Ce sont des substances thermolabiles : détruites rapidement à 75° C, elles résistent dix minutes à 50° C à pH 7. Les pyocines ne sont pas dialysables : après quatre jours en sac de cellophane contre l'eau distillée, à +4° C, on observe une légère concentration de la substance ; cependant, elles diffusent assez rapidement dans la gélose. Lorsqu'on filtre des préparations de pyocine, une partie importante de l'activité est retenue par les bougies Chamberland L3 ; pour stériliser les préparations de pyocine, il convient d'avoir recours à la technique préconisée par Fredericq [11] pour les Entérobactériophages et les colicines : agitation énergique et répétée de la culture avec quelques gouttes de chloroforme.

L'action des enzymes protéolytiques permet de diviser les pyocines en deux groupes : les unes (C2, C4, C5, P3) sont sensibles à la trypsine dans les conditions favorables de pH et de température (50° C, pH 8,2) ; au contraire, les autres (C10, P4, P6, P7) résistent à l'action de cet enzyme.

Deux pyocines (C2 et P3) de titre élevé, relativement résistantes à 75° C, ont été soumises à l'action de la papaine en milieu neutre ; nous avons constaté une perte rapide de l'activité par rapport au témoin sans enzyme. Les pyocines étudiées ici sont insensibles à l'action de la désoxyribonucléase dans les conditions optimales (pH = 7,5 ; 0,03 M Mg SO<sup>4</sup> ; 37° C pendant deux heures ; rapport enzyme/substrat variable).



On peut concentrer et purifier partiellement les pyocines par précipitation des solutions avec du sulfate d'ammonium : après addition d'une quantité suffisante pour obtenir une solution finale de 70 à 80 p. 100 de ce sel, on précipite la presque totalité de l'antibiotique. Il en est généralement de même si l'on ajoute à 1 volume de la solution antibiotique à 0° C, 10 volumes d'acétone à — 12° C ; toutefois tous les solvants organiques ne conviennent pas : c'est ainsi que l'alcool éthylique paraît dénaturer la pyocine C10.

Ces substances sont extrêmement résistantes aux rayons U. V., propriété qui pourrait être mise à profit pour les débarrasser des phages de lysogénéité qui accompagnent ces particules : une dose vingt fois supérieure à celle qui inactive en deux minutes 95 p. 100 d'une préparation de phage pyocyanique de lysogénéité respecte l'intégrité des différentes pyocines étudiées.

Les pyocines se comportent donc comme des substances protéiques, ou tout au moins, comme si elles possédaient dans leurs particules une fraction protéique. Elles diffèrent par leurs propriétés de la plupart des substances antibiotiques telles que la pyocyanine, l'acide pyolipique et les substances pyo [43] déjà étudiées. Au contraire, elles présentent une parenté évidente avec les colicines.

#### ESSAIS DE TRANSFERT DES PROPRIÉTÉS PYOCINOGÈNES.

Les pyocines et les colicines appartenant au même groupe des bactériocines, nous avons recherché, par analogie, si le transfert des propriétés pyocinogènes pouvait être réalisé comme celui des propriétés colicinogènes. Rappelons que Fredericq [2] a montré récemment qu'une souche non colicinogène, cultivée en présence d'une souche colicinogène, acquérait la propriété héréditaire de produire la colicine spécifique de cette souche. C'est ce que nous appelons transfert des propriétés colicinogènes ; le terme de transduction doit être écarté, Fredericq ayant démontré que les phages n'interviennent pas comme agents vecteurs dans ce phénomène [14]. Malgré les nombreuses tentatives que nous avons faites, nous n'avons pas encore réussi le transfert des propriétés pyocinogènes. Nous nous sommes heurté successivement à des difficultés inattendues : 1° la streptomycino-résistance des souches d'Angleterre, qui a nécessité l'emploi de milieux sélectifs contenant une concentration supérieure à la concentration habituelle de 20 µg de streptomycine/cm<sup>3</sup> (60 µg ou 80 µg suivant les souches considérées) ; 2° la fréquence des propriétés lyso-gènes ou pyocinogènes (ou les deux à la fois), qui nécessite la préparation de souches à transformer et de souches révélatrices résistantes à ces deux facteurs ; 3° si les deux écueils

précédents peuvent être évités, le transfert de la streptomycino-résistance de la souche à transformer à la souche pyocinogène vectrice d'un transfert éventuel, est venu singulièrement compliquer l'étude de cet important problème (la streptomycine employée dans la méthode de Fredericq permet généralement d'éliminer la fraction colicinogène de la culture mixte, pour ne conserver que la population susceptible d'être rendue colicinogène par transfert de cette propriété). Le transfert de la streptomycino-résistance a pu être prouvé en caractérisant la souche de la culture susceptible de subir le transfert (souches P10 et C15 non lysogènes et non pyocinogènes dans les conditions de nos expériences) par différents marqueurs : résistance à une ou deux pyocines, nature du pigment élaboré, etc. ; les clones auréolés prélevés au cours de cette expérimentation se sont révélés sensibles aux pyocines considérées et élaboraient le pigment caractéristique de la souche pyocinogène utilisée. Nous en avons conclu que les clones n'étaient pas constitués par P10 ou C15 rendus pyocinogènes, mais que P10 et C15 avaient simplement transféré leurs propriétés de streptomycino-résistance aux souches pyocinogènes mises à leur contact.

#### DISCUSSION.

De cette étude, il résulte que l'espèce pyocyane, comme l'espèce *E. coli*, possède fréquemment la propriété d'élaborer des substances antibiotiques appartenant au groupe des bactériocines. Colicines et pyocines ont en commun les propriétés générales qui définissent le groupe des bactériocines : action létale, structure particulière, nature protéique (ou à fraction protéique). Mais leur gamme d'activité bien délimitée dans la systématique microbienne (les Entérobactériacées d'une part, les *Pseudomonas* de l'autre) les différencie nettement. Ceci justifie pleinement le terme de pyocine qui a été donné par Jacob à cette catégorie d'antibiotiques.

#### RÉSUMÉ.

La recherche des propriétés antibiotiques parmi 15 souches de *Pseudomonas pyocyanea* a permis d'isoler sans difficulté 10 échantillons qui élaborent des pyocines.

La souche antibiotique C10 de Jacob ne constitue donc pas un échantillon exceptionnel, mais un exemple de la propriété pyocinogène qui marque fortement cette espèce.

Les propriétés physico-chimiques générales des pyocines étudiées peuvent s'énoncer comme suit : ce sont des substances thermolabiles, non dialysables, diffusibles en gel d'agar, parfois sensibles aux enzymes protéolytiques (trypsine, papaïne), antigéniques, résistantes à l'action de la désoxyribonucléase et aux

U. V. (longueur d'onde principale, 2 537 Å) ; elles sont précipitables de leurs solutions par le sulfate d'ammonium à 70-80 p. 100 de saturation et par 10 volumes d'acétone à la température de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

L'étude de leurs propriétés physico-chimiques complétée par celle de leur propriétés biologiques permet de définir les pyocines comme des particules létales, de nature protéique ou comprenant, tout au moins, une fraction protéique, dépourvues d'acide désoxyribonucléique (différence fondamentale avec les bactériophages) et dont la gamme d'activité se limite essentiellement aux Pseudomonadacées. Cette dernière constatation les sépare nettement des colicines et justifie pleinement le terme de pyocine donné par Jacob à la substance antibiotique élaborée par la souche C10 de L. Dickinson.

Cette nouvelle catégorie d'antibiotiques diffère également, par ses propriétés, des substances antibiotiques telles que la pyocyanine, l'acide pyolipique et les « composés pyo », isolés antérieurement des cultures de *Ps. pyocyanea*.

Par analogie avec les propriétés colicinogènes, nous avons tenté d'effectuer le transfert des propriétés pyocinogènes. Au cours de ces essais, des difficultés inattendues : fréquence dans l'espèce des propriétés lysogènes et pyocinogènes et transfert de la streptomycino-résistance de la souche à transformer à la souche pyocinogène vectrice du transfert éventuel, ne nous ont pas permis d'obtenir un résultat positif.

#### SUMMARY.

Among 15 strains of *Ps. pyocyanea*, 10 were found to produce antibiotics (pyocines).

So Jacob's antibiotic C10 strain is not an exception, but an example of the marked pyocinogenic character of this species.

The general physical and chemical characteristics of pyocines may be summarized as follows : they are inactivated by heating, do not dialyse, are diffusible in agar gel, sometimes sensitive to proteolytic enzymes (trypsin, papain), possess antigenic properties, are resistant to deoxyribonuclease and to ultraviolet radiation (principal wavelength, 2 537 Å) ; they are precipitated from their solutions by 70-80 p. 100 saturated ammonium sulphate and by 10 vol. acetone at  $-10^{\circ}\text{C}$ .

The study of their physical, chemical and biological properties allows to define them as lethal corpuscles of protein nature or containing at least a protein fraction, deprived of deoxyribonucleic acid (which constitutes a fundamental difference from bacteriophages) and whose activity is essentially directed on

*Pseudomonadaceae*, thus showing a pronounced difference from colicines and fully justifying the name « pyocine » by which Jacob designates the antibiotic substance produced by Dickinson's C10 strain.

This new category of antibiotics also distinguishes itself by its properties from other antibiotic substances such as pyocyanine, pyolipic acid and « pyo compounds » previously isolated from *Ps. pyocyanea* cultures.

We have tried to obtain transfers of pyocinogenic properties, such as have been obtained with colicinogenic properties. We encountered unexpected difficulties which prevented us from obtaining positive results : frequent occurrence of lysogenic and pyocinogenic properties, transfer of streptomycin resistance in the strain we intended to endow with the pyocinogenic property, to the pyocinogenic strain from which the transfer was supposed to be obtained.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] JACOB (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 149.
- [2] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 399.
- [3] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1276.
- [4] HAMON (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 336.
- [5] CONGE (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 368.
- [6] WARNER (P. T.). *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 112 et 242.
- [7] NICOLLE (P.), LE MINOR (L.), BUTTIAUX (R.) et DUCREST (P.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, **136**, 480.
- [8] GRATIA (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1040.
- [9] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1624.
- [10] HAMON (Y.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1240.
- [11] FREDERICQ (P.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1946, **9**, 385.
- [12] BERGSTROM (S.), THEORELL (H.) et DAVIDE (H.). *Arch. Bioch.*, 1946, **10**, 165.
- [13] HAYS (E. E.), WELLS (I. C.), KATZMAN (P. A.), CAIN (C. K.), JACOBS (F. A.), THAYER (S. A.), DOISY (E. A.), GARY (W. L.), ROBERTS (E. C.), MUIR (R. D.), CARROLL (C. J.), JONES (L. R.) et WADE (N. D.). *J. biol. Chem.*, 1945, **159**, 725.
- [14] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 624.

## SUR QUELQUES CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES LEVURES DE VIN

par MADELEINE LAFON (\*).

(Laboratoire d'Oœnologie et Chimie agricole  
de la Faculté des Sciences de Bordeaux)

Nous avons étudié dans plusieurs travaux la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique par différents genres et espèces de levures et nous avons essayé de baser sur ces caractères une classification biochimique [1]. Dans nos essais, les fermentations étaient généralement conduites à 25° C sur moût de raisin dans diverses conditions d'aération : flacons fermés par un tampon d'ouate serrée qui réalise des conditions d'aérobiose ménagée ; flacons fermés par un bouchon muni d'un tube de verre très finement effilé qui empêche toute pénétration d'air tant que le dégagement de gaz carbonique est abondant ; flacons munis d'un barboteur à mercure, réalisant l'anaérobiose complète.

On sait que la fermentation alcoolique normale des sucres par les levures donne naissance, en plus de l'alcool et du gaz carbonique, à des produits secondaires par le mécanisme de la fermentation glycéropyruvique de Neuberg. L. Genevois [2] a établi l'équivalence entre le glycérol (*g*) et la somme des autres produits secondaires : acide acétique (*a*), acide succinique (*s*), 2,3 butanediol (*b*), acétoïne (ou acétylméthylcarbinol) (*m*), éthanal libre restant (*h*), chacun d'eux étant affecté d'un coefficient tiré de l'équation chimique de sa formation. Il a donc proposé la relation :

$$5 s + 2 a + b + 2 m + h = \Sigma \leq g.$$

Les analyses ont montré que  $\Sigma$  est de l'ordre de 0,9 *g* et nos travaux précédents ont confirmé ces résultats.

Nous avons trouvé au moyen d'analyses détaillées des milieux fermentés par les différents genres et espèces de levures, que cette équation d'équivalence se vérifie pour toutes les levures des genres *Saccharomyces* et *Saccharomycodes* et pour certaines *Torulaspora*, même en milieu aéré; ces levures ont un métabolisme uniquement fermentatif.

Pour un autre groupe de levures comprenant les genres *Toru-*

(\*) Manuscrit reçu le 29 février 1956.



*lopsis* et *Hansenula*, cette équation n'est valable qu'en anaérobiose absolue ; elle ne l'est plus pour des aérations même très faibles ; ces levures forment beaucoup d'acide acétique et de l'acide succinique dont une part est due à la respiration.

Enfin pour les levures des genres *Kloeckera* et *Hanseniaspora*, le bilan précédent est correct si l'aération est très faible, mais il ne l'est pas en milieu plus aéré.

Nous obtenons ainsi une première classification des levures basée sur leur pouvoir oxydatif, c'est-à-dire en dernier ressort sur les intensités respectives de la fermentation et de la respiration.

Nous avons cherché une autre différenciation dans les proportions des produits secondaires formés. Nous avons constaté que le rapport du glycérol à l'alcool, en fin de fermentation et toutes conditions égales, autrement dit le taux de la fermentation glycéropyruvique par rapport à la fermentation selon Gay-Lussac, varie peu d'une levure à l'autre et ne permet pas de les distinguer. Par contre, elles se différencient par l'utilisation qu'elles font de l'éthanal, contre-partie du glycérol, c'est-à-dire par les proportions que présentent entre eux les produits secondaires autres que le glycérol.

Les quantités des produits secondaires formés sont liées aux taux, dans la cellule de levure, des divers enzymes responsables de leur formation. Ainsi les levures qui forment beaucoup d'acide acétique doivent être riches en aldéhydomutase. Celles qui forment beaucoup d'acétoïne et de 2,3 butanediol doivent renfermer un taux élevé de l'enzyme responsable de la condensation acétoïnnique. La composition du liquide fermenté reflète dans une certaine mesure la composition enzymatique de la levure et on peut tenter de baser sur ce critère une différenciation des levures travaillant dans des conditions comparables. Il y a ainsi des levures glycérogènes, succinogènes, acétogènes. On n'obtient pas cependant, sur ce principe, une véritable classification des levures, car les taux de ces enzymes varient suivant la composition du milieu, notamment en facteurs de croissance [3], et les conditions.

Des mesures plus précises des intensités respiratoire et fermentative restent donc la base d'une différenciation physiologique des levures.

#### RESPIRATION ET FERMENTATION

##### COMPARÉES DES DIFFÉRENTS GENRES ET ESPÈCES DE LEVURES.

Nous avons mesuré à l'appareil de Warburg les intensités respiratoire et fermentative d'une soixantaine de souches de levures, les unes isolées de vins et de raisins de la Gironde et identifiées par S. Domercq et E. Peynaud [4], les autres étant des souches

de référence provenant du « Centraalbureau voor Schimmelcultures » de Delft.

Les mesures ont porté sur des cellules jeunes, cultivées sur milieu synthétique, complet au point de vue matières minérales, substances azotées et vitamines, et prélevées au même stade de développement. Cette dernière condition est essentielle, car les intensités respiratoires des cellules d'une même souche de levures, cultivées en milieu sucré non agité, en semi-anaérobiose, c'est-à-dire en flacons simplement bouchés d'un tampon de coton, varient beaucoup suivant le stade de développement de la culture. En effet, pendant les premières vingt-quatre heures de la fermentation, au moment où on constate un abaissement du potentiel d'oxydoréduction du milieu de culture, il n'y a pas d'oxygène libre dans le milieu en fermentation et la respiration des cellules n'est pas mesurable dans nos conditions d'expérience ; par la suite, lorsque l'oxygène pénètre dans le milieu, il apparaît une intensité respiratoire qui croît avec la quantité de sucre fermenté, et diminue à la fin avec le nombre de cellules vivantes. Cette évolution est en accord avec les expériences et les conclusions d'Ephrussi et Slonimski, qui ont montré le caractère adaptatif des enzymes respiratoires [5].

L'intensité fermentative reste au contraire relativement constante pendant toute la durée de la fermentation et ne s'abaisse qu'à la fin de la fermentation, lorsque le nombre de cellules vivantes diminue (tableau I).

TABLEAU I. — Evolution des intensités respiratoire et fermentative au cours de la fermentation.

Temps en heures	Sucre fermenté g/l	$Q_{O_2}$	$Q_{CO_2}$
15	8	< 2	307
20	20	< 2	324
40	45	13	319
60	67	20	291
90	69	20	296
110	72	16	290
180	74	14	162

Milieu à 75 g de sucre par litre. Les intensités sont exprimées en millimètres cubes de gaz par milligramme de levure sèche et par heure.

Le tableau II expose quelques-uns des résultats obtenus. La valeur  $Q_{CO_2}$  qui exprime l'intensité fermentative en présence d'air, c'est-à-dire dans des conditions où il y a aussi respiration,

confirme les faits connus depuis Meyerhof [6]. Le rapport de l'intensité respiratoire ( $Q_{O_2}$ ) à l'intensité fermentative en atmosphère de  $CO_2$  ( $Q_{CO_2}^{CO_2}$ ) permet d'exprimer le caractère oxydatif ou fermentatif d'une levure [7].

TABLEAU II. — Intensités respiratoire et fermentative des levures de vin.

L E V U R E		$Q_{O_2}$	$Q_{CO_2}$	$Q_{CO_2}^{CO_2}$
Sacch. ellipsoïdeus,	Saint-Emilion	12	239	264
Sacch. ellipsoïdeus,	Médoc	17,5	218	244
Sacch. oviformis,	C B S *	12	176	164
Sacch. chevalieri,	C B S	11	191	249
Sacch. italicus,	C B S	18	197	225
Sacch. steineri,	C B S	2,6	237	246
Sacch. uvarum,	Grézillac	15	164	224
Sacch. fructuum,	C B S	18	216	260
Sacch. carlsbergensis,	Montbazillac	13	165	205
Sacch. heterogenicus,	C B S	0	119	149
Sacch. acidifaciens,	C B S	19	64	175
Sacch. bayanus,	C B S	14	144	219
Sacch. elegans,	Sauternes	14	23	78
Sacch. veronae,	C B S	0	95	119
Saccharomycodes ludwigii,	Blasimon	11	59	95
Torulaspora rosei,	Ste Foy	16	63	81
Pichia fermentans,	Pomerol	49	3	45
Pichia membranaefaciens,	Sauternes	11	13	42
Candida mycoderma,	Saint-Emilion	24	0	1,7
Candida pulcherrima,	Saint-Emilion	29	36	89
Hansenula anomala,	Puisseguin	51	11	35
K. apiculata,	Médoc	17	88	105
K. africana,	Cambe	7	185	227
Torulopsis bacillaris,	Camblanes	20	135	181
Debaryomyces hansenii,	Puisseguin	11	0	0
Brettanomyces vini,	Quinsac	2,6	31	52

Les intensités sont exprimées en millimètres cubes de gaz par milligramme de levure sèche et par heure.

\* C B S = Centraalbureau voor Schimmelcultures de Delft.

Nous avons pu distinguer de cette façon, parmi les levures étudiées, six groupes :

1° Levures uniquement oxydatives. Les *Debaryomyces* et *Candida mycoderma* isolées de moûts et de vins ne produisent pas de fermentation des sucres ou seulement des traces. Les intensités respiratoires sont de l'ordre de 25.

2° Les *Pichia fermentans* et les *Hansenula anomala* présentent une intensité respiratoire souvent égale et parfois supérieure à leur intensité fermentative ; pour *Hansenula anomala*, la respiration est une fois et demie la fermentation. Mais pour *Pichia membranaefaciens*, la respiration est le quart de la fermentation.

3° Les *Candida pulcherrima* sont assez oxydatives et peu fer-

mentatives. Le rapport respiration/fermentation est de l'ordre de 30 pour 90, soit un pourcentage de respiration de 33 p. 100.

4° Pour *Saccharomyces acidifaciens* et *elegans*, bien connus pour être légèrement oxydatifs, le pourcentage de respiration dépasse 10 p. 100 et atteint 13 à 18 p. 100. De même, *Kloeckera apiculata* entre dans cette catégorie avec 16 p. 100. L'intensité fermentative est de 100 à 150 pour une intensité respiratoire de 15 à 20. Pour *Torulaspora rosei* et *Saccharomycodes ludwigii*, les pourcentages considérés sont respectivement de 20 et 12 p. 100, les intensités fermentatives étant 80 et 95.

5° Dans le genre *Saccharomyces*, exception faite des deux espèces précédentes, le rapport de la respiration à la fermentation est toujours inférieur à 10 p. 100, pour des intensités fermentatives de 200 à 300. Il en est de même, avec des intensités fermentatives un peu plus faibles, pour *Kloeckera africana* et *Torulopsis bacillaris*.

6° Enfin les *Brettanomyces*, levures à métabolisme lent, présentent des intensités respiratoires très faibles, pour des intensités fermentatives de l'ordre de 50.

Nous obtenons ainsi une classification des levures assez proche de celle qui avait été établie d'après les bilans des produits secondaires de la transformation du sucre et que nous avons résumée au début de ce travail. Les mesures à l'appareil de Warburg nous ont permis de la préciser et de la nuancer.

#### FORMATION RESPECTIVE D'ACÉTOÏNE ET DE 2,3 BUTANEDIOL.

Il a été indiqué qu'au cours de la fermentation du sucre par les levures, il se formerait seulement de l'acétoïne ( $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CO} - \text{CH}_3$ ) en milieu aéré, et seulement du 2,3 butanediol ( $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$ ) à l'abri de l'air. On a encore affirmé que certaines espèces de levures donneraient exclusivement de l'acétoïne, tandis que d'autres formeraient uniquement du 2,3 butanediol, au cours de la phase active de la fermentation.

Nous avons toujours observé la formation parallèle de ces deux corps. Nous avons voulu systématiser cette étude, la relier aux données des mesures du paragraphe précédent et l'étendre à toutes les souches étudiées. Nous avons dosé l'acétoïne et le 2,3 butanediol au cours de la phase active de la fermentation, c'est-à-dire pendant la fermentation des premiers 50 à 100 g de sucre et à la fin de la fermentation d'un milieu synthétique à 174 g de sucre par litre. Le tableau III expose quelques-uns des résultats obtenus.

Si nous considérons d'abord la formation de ces corps en fonction du temps, nous constatons que le rapport 100 *m/b* de l'acétoïne au 2,3 butanediol, exprimés tous les deux en milli-

TABLEAU III. — Formation d'acétoïne et de 2,3 butanediol par les levures de vin.

L E V U R E	Phase de la fermentation active				Fin de la fermentation		
	Sucre fermenté, g/l	Acétoïne mmol/l	2,3butanediol mmol/l	100 <sup>m</sup> /h	Sucre fermenté g/l	Acétoïne mmol/l	2,3butanediol mmol/l
Sacch. ellipsoideus, Saint-Emilion	99	0,7	3,4	21	172	0,1	5,8
Sacch. ellipsoideus, Médoc	97	0,5	3,4	15	173	0,08	5,8
Sacch. oviformis, C B S*	42	0,7	1,4	50	167	0,5	6,5
Sacch. chevalieri, C B S	39	0,4	1,4	29	170	0,1	4,3
Sacch. italicus, C B S	49	0,3	1,8	17	173	0,1	4,4
Sacch. steineri, C B S	42	0,2	1,6	12	174	0,4	5,1
Sacch. uvarum, Grézillac	49	0,6	2,1	29	165	0,1	6,6
Sacch. fructuum, C B S	49	0,4	2,5	16	174	0,1	5,4
Sacch. carlsbergensis, Monbazillac	49	0,6	2,4	25	173	0,1	5,4
Sacch. heterogenicus, C B S	35	0,7	1,8	39	158	0,9	12,1
Sacch. acidifaciens, C B S	19	0,7	1,5	54	144	1,6	3,1
Sacch. bayanus, C B S	58	1,8	1,7	106	170	0,9	10,9
Sacch. elegans, Sauternes	26	0,2	1,4	14	171	0,3	8,6
Sacch. veronae, C B S	55	0,7	3,2	22	149	0,3	5,6
Saccharomyces ludwigii, Blasimon	35	0,4	1,2	33	141	1,1	0,8
Torulaspora rosei, Sainte-Foy	35	0,09	2,3	3,9	169	0,09	3,6
Pichia fermentans, Pomerol	31	0,05	1,8	2,8	174	1,0	7,1
Pichia membranaefaciens, Sauternes	27	0,09	1,9	4,7	63	0,3	2,9
Hansenula anomala, Puisseguin	18	0,06	1,2	5	128	0,5	3,3
K. apiculata, Ste Croix du Mont	22	0,5	1,2	42	65	0,9	0,9
K. africana, Cambes	43	1,2	0,8	150	137	2,7	1,9
Torulopsis bacillaris, Camblanes	18	0,6	1,3	46	151	2,1	1,9
Brettanomyces vini, Quinsac	23	traces	1,4	-	173	0,06	1,9
							3,2

Milieu synthétique à 174 g de sucre par litre.

\* C B S = Centraalbureau voor Schimmelcultures de Delft.



molécules par litre, est plus grand pendant la phase active de la fermentation qu'à la fin, pour tous les *Saccharomyces* étudiés, sauf *Saccharomyces acidifaciens*; cela est dû pour une part à l'augmentation du taux de butanediol au cours de la fermentation et d'autre part à la diminution du taux d'acétoïne; il semble que celui-ci passe par un maximum pour 80 g de sucre fermentés environ, comme l'indiquent aussi André et Dupuy [8].

Pour *Saccharomyces acidifaciens*, *Torulaspora rosei* et *Kloeckera africana*, ce rapport reste du même ordre de grandeur du début à la fin, les doses d'acétoïne et de 2,3 butanediol augmentent dans la même proportion.

Pour les *Pichia*, les *Hansenula*, *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis bacillaris* et *Saccharomycodes ludwigii*, la proportion d'acétoïne par rapport au butanediol est plus forte à la fin de la fermentation. Pourtant, sauf dans le cas de *Kloeckera apiculata* et *Saccharomycodes ludwigii*, le taux de butanediol est toujours plus grand à la fin, mais la quantité d'acétoïne subit une augmentation bien plus forte.

Enfin, les *Brettanomyces*, qui fermentent très lentement, forment très peu d'acétoïne et peu de butanediol.

#### RAPPROCHEMENT DE L'INTENSITÉ RESPIRATOIRE ET DE LA FORMATION D'ACÉTOÏNE.

On ne peut établir de relation entre l'intensité de la respiration et la formation d'acétoïne. En effet, au cours de la phase active de la fermentation, il apparaît que les levures qui forment la plus grande proportion d'acétoïne relativement à la somme des corps acétoïniques, telles que la plupart des *Saccharomyces*, présentent un rapport de la respiration à la fermentation inférieur à 10 p. 100 et ont une intensité fermentative très élevée.

Au contraire, des levures pour lesquelles l'intensité respiratoire est du même ordre de grandeur ou même plus élevée que l'intensité fermentative, comme *Pichia fermentans* ou *Hansenula anomala*, forment relativement très peu d'acétoïne au début de la fermentation. D'autres levures, enfin, forment du début à la fin de la fermentation beaucoup d'acétoïne et relativement peu de butanediol, alors que leur intensité fermentative reste beaucoup plus élevée que leur intensité respiratoire.

Il ne semble donc pas qu'on puisse relier l'intensité respiratoire d'une cellule de levure, ou le rapport de cette valeur à l'intensité fermentative, à la capacité de formation exclusive d'acétoïne ou de butanediol pendant la phase active de la fermentation. De même on ne peut pas dire qu'une forte intensité respiratoire détermine une formation prépondérante d'acétoïne, et une grande intensité fermentative, une production plus forte

de 2,3 butanediol. Si l'on peut diviser les levures en deux groupes d'après le pourcentage final d'acétoïne par rapport à la somme acétoïne-butanediol, il n'apparaît pas que ce rapport dépende de la valeur de l'intensité respiratoire. De plus, la différence entre les deux groupes de levures ne se manifeste pas au début, mais au contraire pendant la deuxième partie de la fermentation. Ces résultats montrent que l'acétoïne est formée par le mécanisme de la fermentation et non par une oxydation du butanediol par les enzymes respiratoires.

#### RÉSUMÉ.

La mesure des intensités respiratoire et fermentative de différents genres et espèces de levures de vin sur des cellules prélevées au même stade de développement, permet de mieux préciser les distinctions que nous avons établies entre elles au moyen des bilans des produits secondaires de la transformation du sucre ; la classification obtenue divise les levures en six catégories d'après leur caractère oxydatif ou fermentatif.

Le dosage de l'acétoïne et du 2,3 butanediol formés par ces levures au début et à la fin de la fermentation montre que le taux d'acétoïne ne dépend pas de l'intensité respiratoire et que par conséquent ce corps n'est pas formé par oxydation du 2,3 butanediol.

#### SUMMARY.

The author has previously indicated a technique allowing to distinguish different genera and species of wine yeasts by dosing the secondary substances produced in the course of carbohydrate transformation. In the present article she insists on the improvement of results obtained by always measuring the respiratory and fermentation degree on cells belonging to identical development stages.

This allows to classify yeasts into six categories, each characterized by its oxydative or fermentative properties.

Dosage of acetoin and 2,3 butanediol formed by the yeasts under study at the onset and at the end of fermentation shows the concentration of acetoin to be independent of the degree of respiration ; in consequence the production of acetoin is not due to oxydation of 2,3 butanediol.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [4] LAFON (M.). Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. *Thèse Sciences Physiques*, Bordeaux 1955 et *Ann. Techn.*, 1955, **4**, 169 et 241.  
— PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). *Ind. agr. et alim.*, 1952, **69**, 397.

- [2] GENEVOIS (L.). *Bull. Soc. Chim.*, 1954, **21**, 450.
- [3] RIBEREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 1549.
- [4] DOMERCQ (S.). Etude systématique des levures de la Gironde. *Thèse Ingénieur-Docteur*, Bordeaux, 1956. — PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). *Ann. Techn.*, 1953, **4**, 265.
- [5] EPHRUSSI (B.) et SLONIMSKI (P. P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 685 ; *Bioch. Bioph. Acta*, 1950, **6**, 256. — SLONIMSKI (P. P.). *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson, édit., Paris, 1953.
- [6] MEYERHOF (O.). *Biochem. Z.*, 1925, **162**, 43.
- [7] LAFON (M.), PEYNAUD (E.) et RIBEREAU-GAYON (J.). *Soc. Chim. Biol.* 1956, **1**, 12.
- [8] ANDRÉ (P.). et DUPUY (P.). *Ann. Techn.*, 1953, **2**, 31.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

**Séance du 3 Mai 1956**

Présidence de M. PRÉVOT.

---

## COMMUNICATIONS

### **SUR LA VALEUR ANTIGÉNIQUE ET VACCINANTE DU VIRUS DE NEWCASTLE INACTIVÉ PAR LA BÊTA-PROPIOLACTONE**

par P. LÉPINE et P. ATANASIU.

(*Institut Pasteur, Service des Virus*)

Une récente communication de Mack et Chotisen [1] sur les réactions sérologiques des animaux ayant reçu du virus de Newcastle inactivé par la  $\beta$ -propiolactone nous incite à publier une note préliminaire portant sur des essais poursuivis depuis plusieurs mois sur différents virus, et en particulier le virus de Newcastle, traités par la  $\beta$ -propiolactone. Ces travaux ont été entrepris à la suite des essais de LoGrippe et Hartman [2] montrant l'antigénicité des virus traités par la  $\beta$ -propiolactone, substance déjà utilisée par Hartman, LoGrippe et Kelly [3] pour la stérilisation du plasma sanguin.

La  $\beta$ -propiolactone a été découverte par Johansson en 1915, mais son importance industrielle n'a commencé qu'en 1944 avec l'essor des matières plastiques. La  $\beta$ -propiolactone est la substance mère de l'acide acrylique qui sert à préparer les acrylates de méthyl, éthyl, butyl et autres, vulgairement connus sous le nom de résines acryliques, et dont l'emploi en médecine et en biologie s'est avéré particulièrement important. La  $\beta$ -propiolactone se présente comme un liquide incolore, visqueux, d'une densité de 1,1460, doué de propriétés vésicantes et émettant des vapeurs toxiques. Le produit n'est stable qu'à la condition d'être conservé à l'obscurité, à une température inférieure à 0°, dans des récipients en verre ou en acier inoxydable. Produit très instable, la  $\beta$ -propiolactone réagit avec la plupart des sels et solvants ou composés organiques. Avec la plupart des métaux, la réaction est

explosive. Au contact de l'eau, la  $\beta$ -propiolactone se transforme en acide hydracrylique puis en acide acrylique, la réaction étant violente à la température ordinaire, mais ralentie lorsqu'elle se produit à 0°. En présence de protéines, une cascade de composés instables prennent naissance, qui aboutissent finalement en un court espace de temps à la production d'acrylate inactifs et dépourvus de toxicité. Il semble qu'en ce qui concerne les virus ceux-ci subissent, lors de la dégradation de la  $\beta$ -propiolactone, une inactivation qui leur fait perdre leur pouvoir infectieux, mais respecte plus ou moins intégralement leur pouvoir antigénique. La réaction est stable et irréversible.

La présente note portera uniquement sur les essais auxquels nous avons procédé avec le virus de Newcastle, souche Var 1949. La source du virus a été constituée par des liquides chorio-allantoïdiens et amniotiques d'embryons de poulet infectés, récoltés quarante-huit heures après inoculation à l'œuf de 0,05 ml d'une dilution virulente à  $10^{-3}$ . 100 ml de liquide virulent sont additionnés de 10 ml d'un liquide extemporanément obtenu en mélangeant 9 ml d'eau glacée distillée stérile et 1 ml de  $\beta$ -propiolactone (1). La concentration finale de  $\beta$ -propiolactone dans la suspension de virus est ainsi de 0,1 p. 100. On opère à la température de 0°, les liquides étant préalablement refroidis à la glacière et maintenus constamment dans un bain-marie glacé pendant toute l'opération. Le mélange effectué, on y ajoute une certaine quantité de carbonate de calcium en poudre, et on place le tout à la température de l'étuve pendant une heure. Au bout de ce temps, le pH est vérifié et ajusté à pH 7-7,2 par addition de petites quantités d'une solution concentrée de bicarbonate de soude. Le produit terminé est conservé à la glacière; au bout de vingt-quatre heures, on ajuste une nouvelle fois le pH, une lente acidification se produisant, vraisemblablement par suite de la transformation des résidus d'acide hydracrylique en acide acrylique.

*Contrôle de l'inactivation du virus.* — L'inoculation, après vingt-quatre heures, du virus traité puis neutralisé se montre inoffensive pour l'œuf, même si le virus inactivé est concentré et quel que soit le nombre des œufs inoculés. Mêmes résultats au bout de plusieurs jours et après conservation à la glacière. Par contre, le virus témoin, conservé dans les mêmes conditions et non traité par la  $\beta$ -propiolactone, montre une  $DL_{50}$  de  $10^{8,5}$ . Le virus est donc totalement inactivé.

*Pouvoir hémagglutinant du virus inactivé* (tableau I). — On voit que malgré l'inactivation totale du produit, il n'y a aucune diminution du pouvoir hémagglutinant du virus inactivé qui conserve sur les hématies de poulet le même pouvoir hémagglutinant que le virus actif.

*Pouvoir antigène du virus inactivé.* — Six coqs Leghorn provenant d'un élevage sain, indemnes de maladie de Newcastle et non vaccinés, servent à l'expérience. Leur sérum examiné avant l'expérience est dépourvu de tout pouvoir inhibiteur de l'hémagglutination par le virus de Newcastle. L'injection du virus inactivé est faite par voie intramusculaire, pratiquée à l'intervalle d'une semaine, à la dose de 2, 3 puis 4 ml. Ces inoculations n'entraînent ni réaction locale, ni réaction

(1) Nous avons utilisé le produit pur pour analyses préparé par la Goodrich Chemical Company, Cleveland, Ohio, USA.



TABLEAU I.

Virus	Pouvoir hémagglutinant du virus						Témoins hématies
	80	160	320	640	1280	2560	
Inactivé	+++	+++	+++	+++	+++	0	0
Témoin	+++	+++	+++	+++	+++	0	0

générale. Le sérum des coqs, examiné trente jours après la première inoculation, montre que trois des animaux ont un titre inhibiteur de 1/320, deux de 1/160 et un de 1/80. Le virus inactivé a donc conservé son pouvoir antigène.

*Pouvoir vaccinant du virus inactivé.* — Les six coqs traités et quatre coqs témoins reçoivent par voie buccale une dose infectante représentée par 2,5 g d'émulsion d'un embryon titrant  $10^7$  doses infectantes par millilitre. Tous les témoins succombent le quatrième jour avec les symptômes typiques de la maladie de Newcastle. Les six animaux traités survivent sans présenter aucun symptôme pathologique.

*Conclusion.* — Le virus de Newcastle traité par la  $\beta$ -propiolactone est totalement inactivé en moins de vingt-quatre heures. Le virus inactivé est stable. Il conserve intégralement son pouvoir hémagglutinant. Il fait, d'autre part, preuve sur l'animal d'excellentes qualités antigéniques, et d'un pouvoir vaccinant permettant aux animaux traités par trois injections de virus inactivé de résister victorieusement à l'inoculation d'épreuve de doses considérables de virus pleinement actif.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MACK (W.N.) et CHOTISEN (A.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1956, **91**, 288.
- [2] LOGRIPPO (G.A.) et HARTMAN (F.W.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 123.
- [3] HARTMAN (F.W.), LOGRIPPO (G.A.) et KELLY (A.R.). *Amer J. clin. Path.*, 1954, **24**, 339.

## MODÈLE PERFECTIONNÉ D'UN APPAREIL A TRYPSINATION DES TISSUS POUR CULTURES CELLULAIRES

par GEORGES BARSKI.

(Centre de Recherches d'Immunopathologie  
de l'Association Claude-Bernard, Hôpital Saint-Antoine, Paris  
et Service de virus de l'Institut Pasteur)

La trypsination de tissus animaux en vue d'obtention de suspensions cellulaires cultivables *in vitro*, après avoir été redécouverte et appliquée comme pratique courante par Dulbecco et Vogt [1] et Youngner [2], est devenue à l'heure actuelle une des techniques principales de culture de tissus *in vitro*.

Le procédé proposé par Youngner consistait à mélanger des fragments tissulaires avec de la trypsine dans un mixeur mécanique à hélice [2]. Ce procédé a été remplacé dans de nombreux laboratoires par un système d'agitation magnétique dans des récipients en verre de différentes formes [3, 4].

Après de nombreux essais, nous avons adopté un dispositif de trypsination qui s'inspire de notre ancien appareil [4] ainsi que du dispositif récemment décrit par Rappaport [5]. Il possède par rapport à ce dernier l'avantage d'être plus facile à exécuter et surtout plus commode et pratique à l'usage.

Le dispositif (fig. 1) est exécuté entièrement en verre pyrex. Il comporte deux parties cylindriques qui s'emboîtent l'une dans l'autre. Le cylindre intérieur (65 mm de diamètre intérieur), fermé en haut par un bouchon rodé muni de deux voies d'entrée à robinet, possède un fond formé d'une plaque de verre fritté de porosité « 00 ». Cette porosité permet le passage de particules de 200 à 500  $\mu$  de diamètre ; la plaquette est par conséquent perméable pour des cellules ou des petits agglomérats cellulaires.

Le cylindre intérieur, une fois mis en place, ferme le cylindre extérieur d'une façon étanche grâce à la facette rodée R. Ce dernier porte au niveau du fond une tubulure latérale reliée par l'intermédiaire d'un tube en caoutchouc au récipient C destiné à collecter les cellules.

Pour mettre en marche la trypsination, on dépose les fragments de tissu au fond du cylindre intérieur où se trouve un barreau aimanté enrobé de verre, et on les recouvre d'une solution de trypsine.

Le modèle standard de cet appareil peut recevoir jusqu'à 70 g de tissu et 200 cm<sup>3</sup> de solution de trypsine. Le tissu ainsi immergé dans la trypsine est incubé alors pendant le temps voulu et à la température choisie, l'un et l'autre dépendant de la nature du tissu à trypsiner. On place ensuite l'appareil sur le plateau d'un agitateur magnétique.

Dans la mesure où la pince à vis V est desserrée, la solution de trypsine contenue dans le cylindre intérieur s'écoule à travers la

plaquette en entraînant les cellules ou les agglomérations cellulaires libres. La suspension est aussitôt évacuée à travers la tubulure latérale vers le récipient refroidi C. Pour faciliter cette évacuation, nous mettons au fond du récipient extérieur un petit barreau aimanté supplémentaire qui tourne en même temps que celui du cylindre intérieur et qui chasse la suspension cellulaire vers la tubulure. On peut régler

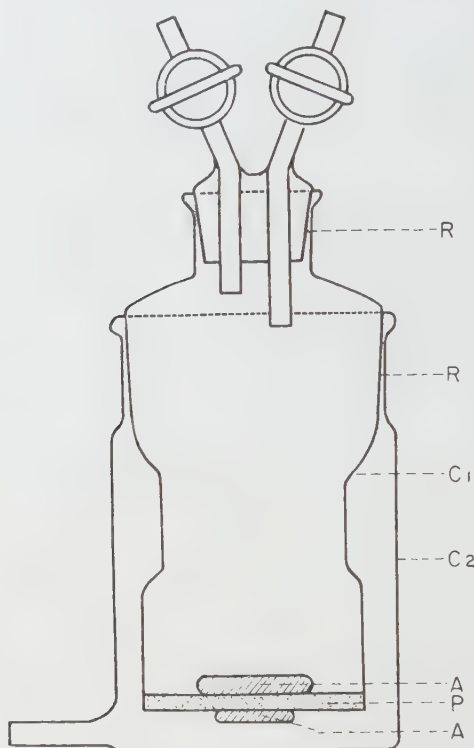


FIG. 1. — Appareil à trypsination assemblé avec le cylindre intérieur  $C_1$ , le cylindre extérieur  $C_2$ , les deux barres aimantées A, A se trouvant l'une au-dessus et l'autre (plus petite) au-dessous de la plaquette filtrante en verre fritté, P.

le débit de l'appareil dans des limites très larges. Pour chaque tissu traité, il existe en fonction de la température une rapidité d'écoulement optimum qui est à établir.

Si on relie l'appareil par en haut à un réservoir de trypsine (voir la fig. 2), son fonctionnement devient automatique comme dans le dispositif décrit par Rappaport [5] : le volume de suspension évacué est aussitôt remplacé grâce à l'étanchéité du dispositif par un volume équivalent de solution de trypsine.

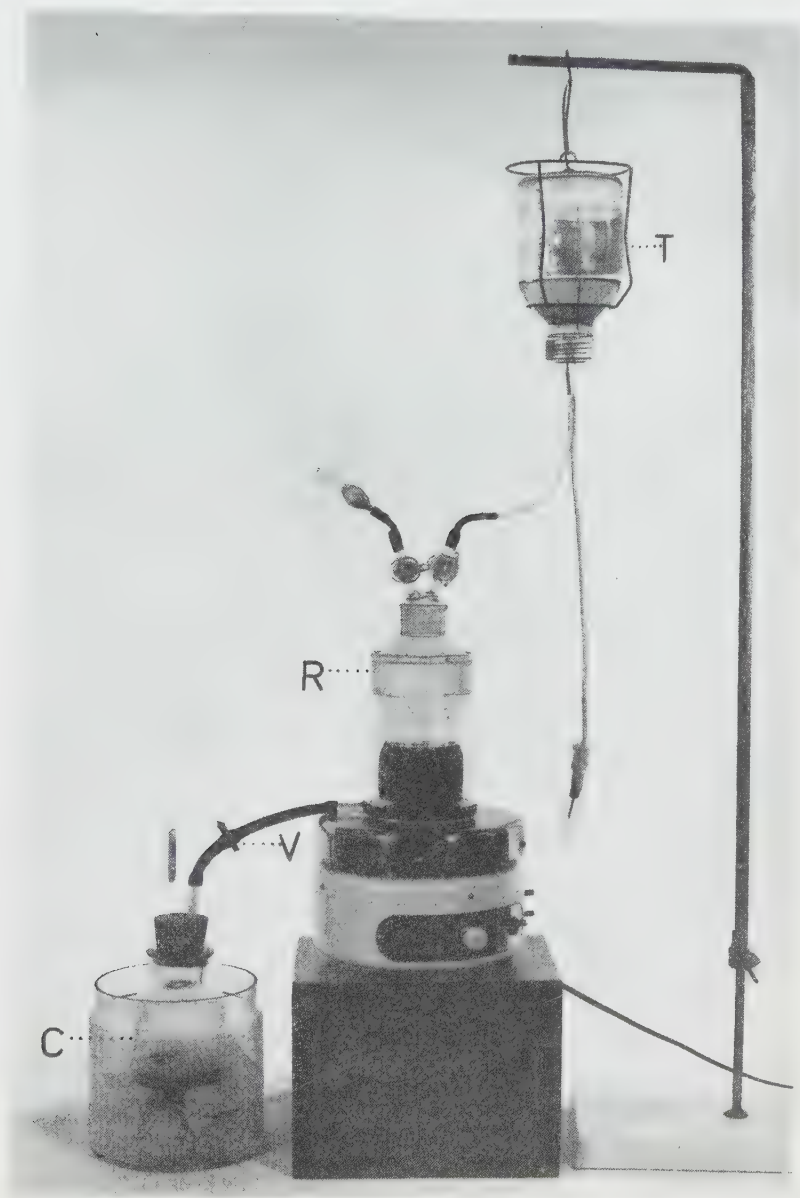


FIG. 2. — Montage complet du dispositif à trypsination  
(Explication dans le texte).

Le nettoyage et la stérilisation de l'appareil ne présentent pas de difficultés. La partie intérieure munie de la plaque de verre fritté se nettoie bien au jet d'eau courante envoyé dans les deux sens. Il est recommandé de la nettoyer de temps à autre à l'acide sulfurique chaud additionné de 1 à 2 p. 100 de nitrate de potassium.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 167.
- [2] YOUNGNER (J.S.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **85**, 202.
- [3] MELNICK (J.L.). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1955, **16**, 755.
- [4] BARSKI (G.), LAMY (M.) et LÉPINE. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 415.
- [5] RAPPAPORT (Ch.). *Bull. OMS*, 1956, **14**, 147.

### PLATINE THERMOSTATIQUE A PERFUSION D'EAU POUR L'OBSERVATION PROLONGÉE DE CELLULES VIVANTES

par R. ROBINEAUX et G. BARSKI.

(Centre de Recherches d'Immuno-Pathologie  
de l'Association Claude-Bernard, Hôpital Saint-Antoine, Paris)

L'observation microscopique prolongée des cellules vivantes nécessite le plus souvent leur maintien à température constante sur la platine du microscope.

Pour y parvenir, plusieurs solutions sont offertes. Il est possible d'enfermer le microscope dans une chambre étuve chauffante thermostatique dont les plus récents modèles proposés, construits en plexiglas, avec commandes extérieures de la platine et des vis de mise au point, constituent une bonne solution [1, 2].

L'un de nous a fait construire une de ces étuves, dont la face antérieure peut recevoir différents types de plaques correspondant aux commandes de différents modèles de microscope (M 10 BK de Wild, W de Zeiss Opton, GF 525 de Winkel [3]). Toutefois, avec ces systèmes, les manipulations sur la platine ne sont pas toujours aisées ; on peut alors recourir à un système de chauffage localisé à la platine elle-même. Plusieurs constructeurs ont proposé des systèmes thermostatiques à résistance chauffante ; ils présentent généralement divers inconvénients.

a) Ils ne s'adaptent le plus souvent qu'au microscope pour lequel ils ont été faits.

b) Ils ne permettent guère que l'utilisation des lames porte-objet de 25 x 70.

c) La fermeture ou l'ouverture thermostatique du circuit électrique entraîne pendant un temps de latence non négligeable des variations



de température au niveau de la chambre d'expérience. Elle est alors le siège, du fait de la faible épaisseur des lamelles porte-objet, de variations de volume, sans doute minimes mais suffisantes, lorsqu'on dispose seulement d'une faible profondeur de champ, pour perdre la mise au point.

Notre problème était le suivant : réaliser une régulation thermique rigoureusement constante au niveau de préparations maintenues dans les chambres à perfusion que nous avons décrites précédemment [4, 5].

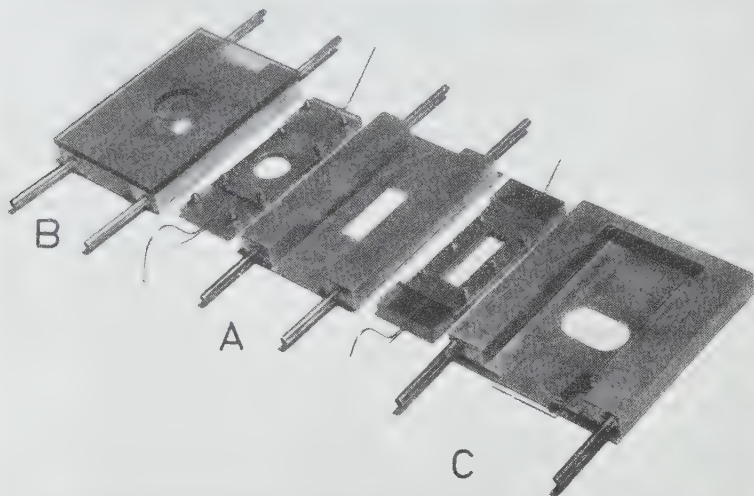


FIG. 1.

Nous avons choisi dans ce but l'eau comme source calorifique, en réalisant un système inspiré de la platine d'Eisenberg.

Nous utilisons un bain-marie électrique chauffant à température constante, réglé au 1/20 de degré C, qui comporte un agitateur et une pompe à circulation incorporés. Celle-ci permet d'assurer à l'extérieur du bain-marie, un débit de 4 l/min.

Nous avons adapté exactement la forme de notre platine aux surfaces de la chambre à perfusion (fig. 1, A). Cette platine comporte une plaque de cuivre rouge de 80 x 55 mm et de 1 mm d'épaisseur sur les grands côtés de laquelle ont été rapportés deux conduits en laiton de section carrée comportant, à chaque extrémité, une tubulure de laiton de 3 mm de diamètre pouvant recevoir les tuyaux en matière plastique d'arrivée et de départ d'eau. Un logement central est ainsi ménagé de 25 mm de largeur dans lequel la chambre vient très exactement s'encastrer. Ses trois faces, inférieure et latérales, peuvent être ainsi chauffées ; une ouverture rectangulaire médiane de 23 x 9 mm, corres-

pendant aux dimensions du système à faces parallèles constitué par les deux lamelles de la chambre de perfusion, permet le passage des rayons lumineux. Enfin, une plaquette de matière plastique percée d'un orifice central pour l'objectif du microscope permet d'assurer une bonne protection contre le refroidissement.

Nos expériences de contrôle nous ont montré l'efficacité de ce système ; la température au niveau de la préparation est rigoureusement constante.

Les variations de température au niveau de la préparation, lorsqu'on fait varier la température du bain-marie, sont linéaires. On note seulement un décalage inférieur à 2°, dû aux déperditions thermiques, pour des variations du bain-marie comprises entre 25° et 45° dans une ambiance de 18°.

Une courbe d'étalonnage permet de définir avec une précision suffisante la température à laquelle doit être porté le bain-marie pour obtenir au niveau de la préparation la température désirée.

Ce système adaptable à différents modèles de microscopes permet une manipulation facile des différents accessoires placés sur la platine de l'instrument. On peut, en outre, perfuser à température constante à l'intérieur de la chambre un liquide quelconque dont on veut étudier l'action sur la cellule. Il suffit de faire circuler ce liquide dans une tubulure plongée dans un échangeur de température, constitué par exemple par une bouteille étanche alimentée grâce à une dérivation convenable par l'eau du bain-marie thermostatique.

Ajoutons que des platines chauffantes similaires peuvent être construites à peu de frais pour d'autres modèles de chambres à perfusion, recevant par exemple les lamelles carrées de 22 x 22 utilisées dans les cultures en goutte pendante (fig. 1, B), ou pour l'observation des préparations sur lames ordinaires de 25 x 75 mm (fig. 1, C).

Enfin, il est possible d'utiliser ces platines à des températures très variables, très basses ou très élevées, en utilisant un liquide circulant convenable. Il faut alors, évidemment, assurer une protection suffisante contre les déperditions calorifiques ou le réchauffement selon qu'on travaillera à température élevée ou basse.

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs décrivent une platine chauffante thermostatique très simple, destinée au maintien des chambres à perfusion qu'ils ont antérieurement décrites. Ces platines permettent de maintenir une température rigoureusement constante. Grâce à un dispositif simple, il est possible de perfuser à l'intérieur des chambres une substance donnée, maintenue à la même température que celle de la platine.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] FRÉDÉRIC (J.). *Research Film*, 1952, 4, 5.
- [2] BRUES (A.M.) et STROUD (A.N.). *Methods in med. Res.*, 1951, n° 4, 253. Year Book Publishers Chicago.
- [3] ROBINEAUX (R.). *Mikroskopie*, 1956 (à paraître).
- [4] ROBINEAUX (R.) et BARSKI (G.). *Mikroskopie*, 1956 (à paraître).
- [5] BARSKI (G.) et ROBINEAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 514.

## RECHERCHES SUR LA FORMATION DE LA CELLULE DE HARGRAVES (\*).

par R. ROBINEAUX, D. BUFTE et R. KOURILSKY.

(Centre de Recherches d'Immuno-Pathologie,  
Hôpital Saint-Antoine, Paris)

On sait que la formation de la cellule de Hargraves (L. E. cell) nécessite la présence :

a) De sérum de malade atteint de lupo-érythémato-viscérinite maligne ;  
b) De noyaux cellulaires réactifs le plus souvent lymphocytaires et granulocytaires, qui seront préalablement lysés par le sérum pathologique ;

c) De cellules phagocytantes polynucléaires ou monocytes à chimiotactisme positif pour les noyaux lysés.

On sait aussi que le facteur sérique responsable (facteur de Haserik) est présent dans la fraction II de Cohn, migre par électrophorèse avec les  $\gamma$ -globulines, et possède les caractères d'un auto-anticorps.

On sait enfin que les corps phagocytés sont constitués par de l'A. D. R. N. dépolymérisé.

La plupart des auteurs qui ont étudié le phénomène L. E. sur des préparations fixées et colorées par le Whright ou le May-Grünwald insistent sur la phagocytose de corps nucléaires libres débarrassés de cytoplasme. Parmi eux, Rebuck et Berman [4], étudiant sur la peau de volontaires humains normaux les stades successifs de formation de cette cellule en présence ou en l'absence de sérum L. E., décrivent en outre des lésions cytoplasmiques précoces, précédant la lyse nucléaire mais qui n'ont pas de caractères spécifiques. En fait, seules les observations faites sur cellules vivantes permettent d'établir exactement la marche du phénomène, la chronologie des lésions et leur spécificité. Très peu de recherches ont été faites dans ce sens. Gold, Mariani et Cappelli [2] pensent que le facteur L. E. frappant un granulocyte normal entraîne la lyse d'un lobe nucléaire qui est expulsé après rupture des filaments interlobaires, ce lobe expulsé, sensibilisé, est alors phagocyté. Stick [3] a confirmé cette conception en suivant le phénomène en contraste de phase. Rohn et Bond ont décrit par colorations vitales [4, 5], l'autolyse nucléaire initiale de polynucléaires qui se transforment en corps L. E. et la phagocytose de ces polynucléaires lysés par d'autres polynucléaires intacts.

Dans ces conditions, le facteur de Haserik agirait comme un sérum anti-leucocytaire banal. C'est ce qui ressort des observations de Bessis et Tabuis [6] qui ont noté, avec des sérums anti-leucocytaires, la forma-

(\*) Nous remercions très vivement le Dr B. Dreyfus, du Centre Régional de Transfusion sanguine, qui a bien voulu nous procurer le sérum qui a permis cette étude.

tion d'images phagocytaires semblables à la cellule de Hargraves, à côté d'images de phagocytes de cellules apparemment intactes.

Toutefois, Rohn et Bond signalent que la phagocytose des cellules lysées n'est effective qu'après une « dissolution » partielle de la membrane cytoplasmique ; Bessis et Tabuis écrivent en rappel que d'autres travaux leur semblent nécessaires pour affirmer l'identité absolue de l'action des sérums anti-leucocytaires hétérologues ou homologues et des sérums de lupo-érythémato-viscérinite maligne.

Il est fondamental, en raison de ses incidences physio-pathologiques, de trancher cette question clairement posée : le facteur de Haserik est-il véritablement spécifique du noyau ou bien agit-il comme un anticorps anti-cellulaire complet ?

Jusqu'ici, à notre connaissance, seules quelques expériences indirectes [6] ont pu montrer des analogies morphologiques entre la cellule L. E. et les images de phagocytose obtenues avec des sérums expérimentaux anti-noyaux. Récemment, un autre argument indirect a été apporté en faveur du caractère anti-nucléaire du facteur de Haserik : des noyaux isolés, incubés avec un sérum L. E. et traités dans un second temps par un sérum antiglobuline, consomment des anticorps antiglobulines, mettant ainsi en évidence la fixation préalable de globulines spécifiques sur les noyaux traités [7].

Nous allons voir que l'étude du phénomène L. E. par la microcinématographie à l'accélééré en contraste de phase nous a permis de réunir des preuves morphologiques indiscutables qui démontrent le caractère spécifiquement nucléaire du facteur de Haserik.

Le sérum provenait d'un malade atteint de lupo-érythémato-viscérinite maligne à un stade d'évolution très avancé ; il fut prélevé quelques jours avant la mort. Les expériences furent faites avec des leucocytes réactifs de provenance variée, leucocytes humains normaux, leucocytes humains de leucémie lymphoïde ou myéloïde, leucocytes inflammatoires de cobaye, leucocytes vivants ou tués. Le sérum fut ajouté aux leucocytes, soit immédiatement avant, soit pendant l'observation. Des témoins furent faits avec des sérums normaux. L'installation microcinématographique utilisée fut celle que nous avons antérieurement décrite [9]. Les enregistrements ont été faits à la température du laboratoire, à une cadence variant de 1 image par seconde à 1 image par

## LÉGENDE DE LA PLANCHE

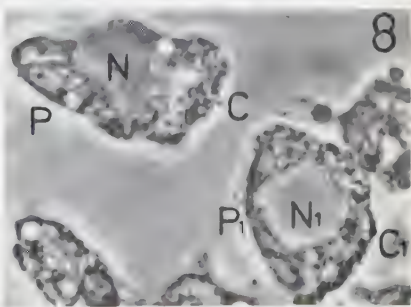
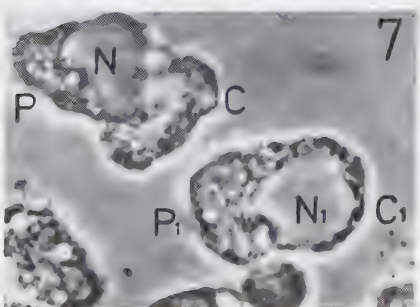
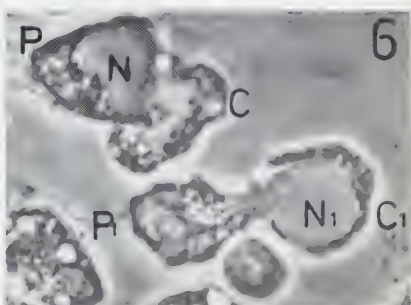
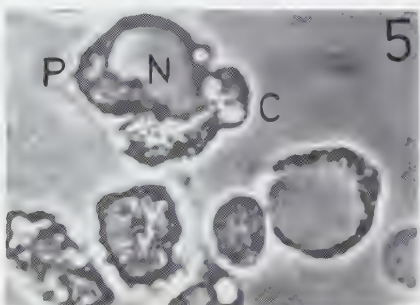
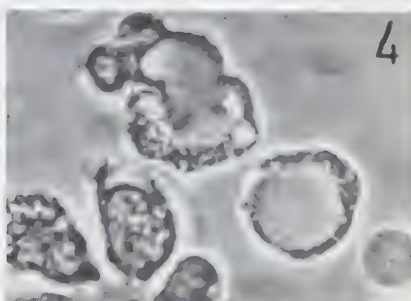
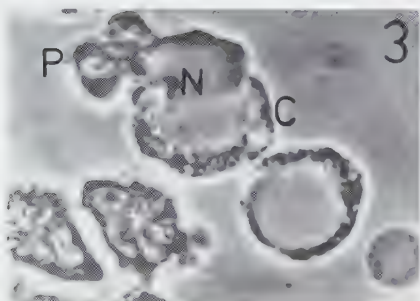
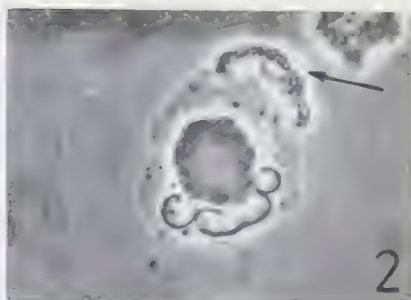
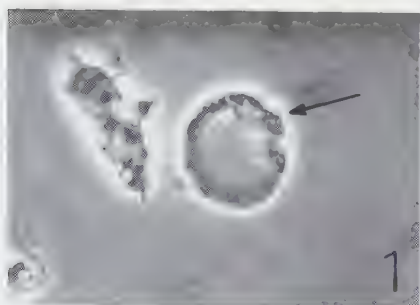
FIG. 1. — Noyau lysé encore entouré de cytoplasme et le leucocyte qui va phagocyter.

FIG. 2. — Le noyau a été seul phagocyté, mais la bande de cytoplasme indiquée par la flèche a été éliminée au dehors.

FIG. 3, 4, 5, 6, 7 et 8. — Images montrant l'extraction d'un noyau (N) de l'intérieur d'une cellule (C) par un phagocyte (P). En 5, 6 et 7 on voit clairement que le cytoplasme de la cellule C est resté en dehors du phagocyte.

Le même phénomène est visible en 6, 7 et 8 où P1 phagocyte le noyau N1 de la cellule C1 et laisse en dehors le cytoplasme qui apparaît sous forme d'une bande plus noire.









cinq secondes, donnant à la projection une reproduction du phénomène accélérée de seize à quatre-vingts fois.

Voici quelques-unes de nos observations ; elles seront publiées prochainement en détail avec les images correspondantes.

*Lyse nucléaire* : Les polynucléaires et les lymphocytes normaux ou leucémiques, les polynucléaires de cobaye sont indifféremment touchés. Dans le cas des polynucléaires, la lyse peut frapper seulement un lobe du noyau qui peut alors être expulsé au dehors où il sera phagocyté. La lyse peut atteindre tout le noyau dont le dessin chromatinien d'abord accentué s'estompe, les lobes fusionnent pour se fondre en une masse amorphe parfois énorme. La membrane nucléaire persiste, cependant, les différences de contraste entre noyau et cytoplasme restent le plus souvent très nettes, elles peuvent aussi s'estomper ; on observe, rarement, l'éclatement du noyau dont le contenu se répand alors dans le cytoplasme.

*Lésions cytoplasmiques* : Nous avons noté plusieurs possibilités. Le cytoplasme peut rester intact alors qu'une partie du noyau se lyse et est expulsée. C'est une éventualité rare. Le plus souvent, il est le siège d'une solation intense, et les granulations sont animées de très vifs mouvements occupant rapidement les expansions hyaloplasmiques émises brutalement par la cellule en souffrance ; pendant ce temps, la lyse s'opère. Cette solation est souvent suivie d'une gélification assez brutale avec arrêt de tous les mouvements granulaires. La gélification peut aussi précéder la lyse nucléaire. Ces lésions ne paraissent pas avoir de caractères spécifiques.

*Phagocytose* : La phagocytose d'un noyau lysé ne s'opère jamais tant que le cytoplasme lésé l'entoure complètement. Quand elle peut s'effectuer, elle est strictement nucléaire. Le noyau est rapidement entouré par le hyaloplasma et les granulations très mobiles du phagocyte, le cytoplasme restant est détaché du noyau et refoulé à l'extérieur.

L'observation la plus importante paraît être cette affinité élective pour le noyau que nous avons démontrée morphologiquement de façon indiscutable. Nos images viennent démontrer que ce cytoplasme est toujours rejeté et ne pénètre pas dans la cellule phagocytée, seul le noyau est absorbé. C'est là la seule preuve directe du caractère spécifiquement nucléaire du facteur de Haserik.

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs étudiant par la microcinématographie en contraste de phase, la formation de la cellule de Hargraves, démontrent le caractère spécifiquement nucléaire du facteur de Haserik. La spécificité de ce facteur pour les noyaux cellulaires reposait seulement, jusqu'ici, sur des preuves indirectes. La microcinématographie des cellules vivantes en apporte la démonstration morphologique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [4] REBUCK (J.W.) et BERMAN (L.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **75**, 259.  
[2] [3] Cités par VATRIN (J.), DUPERRAY (B.) et EUREY (J.). Résumés 8<sup>e</sup> Congrès Derm. et Syphyl. de langue F<sup>re</sup> Nancy, 1 à 67.

- [4] ROHN (R.J.) et BOND (W.H.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, **38**, 944.  
[5] ROHN (R.J.) et BOND (W.H.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, **42**, 939.  
[6] BESSIS (M.) et TABUIS (J.). *Rev. Hemat.*, 1954, **9**, 127.  
[7] MIESCHER (P.), FAUCONNET (M.) et BÉRAUD (Th.). *Exp. Med. Surg.*, 1953, **44**, 173.  
[8] MIESCHER (P.). *Vox Sanguinis*, 1955, **5**, 116.  
[9] ROBINEAUX (R.). *Rev. franç. Et. Clin. et Biol.*, 1956, **1**, 466.

## MÉTHODE DE NUMÉRATION DES BACTÉRIES VIVANTES

par L.-P. DELPY, G. BÉRANGER et M. KAWEH.

(*Institut d'Etat des sérums et vaccins de l'Iran,  
et Institut Mérieux, Lyon*)

Mettant à profit la propriété bien connue que possèdent les cellules vivantes, de transformer le bleu de méthylène en leucodérivé, nous avons établi la méthode suivante, qui permet d'évaluer avec une précision satisfaisante le nombre de bactéries vivantes présentes dans une suspension bactérienne.

La méthode est basée sur trois faits principaux :

1° Si une suspension renfermant des bactéries vivantes et des bactéries mortes est colorée par le bleu de méthylène, le bleu est réduit en leucodérivé, et la suspension se décolore.

2° Pour une souche microbienne déterminée, il existe une corrélation entre le nombre de bactéries vivantes que renferme 1 ml de suspension (NV) et le temps nécessaire à la décoloration de cette suspension. L'influence de la température et de la concentration du colorant peut être neutralisée en rendant ces facteurs constants.

3° Lorsque le nombre total de bactéries mortes et vivantes que renferme 1 ml de suspension (NT) varie, mais que le rapport NT/NV reste constant, les variations de durée de la décoloration sont inversement proportionnelles aux variations de NT.

TABLES DE CORRESPONDANCES. GRAPHIQUES. — Pour chaque souche, il est nécessaire d'établir expérimentalement une table de correspondance, dont un exemple, concernant une souche de *B. abortus* 19, est ici reproduit (tableau I).

Ces tables sont établies en mesurant le temps de décoloration de suspensions telles que NT = 1 milliard de bactéries par millilitre, et que NV décroît de 10 p. 100 en 10 p. 100. Le contrôle des titres est fait par culture de dilutions sur plaques de gélose.

Dans la première colonne sont inscrites les valeurs de NV, exprimées en pour 100 de NT, et dans la deuxième les durées de décoloration mesurées (Durées Standard ou DS).

Si sur un quadrillé millimétrique on porte en abscisse les chiffres de la colonne 2, et en ordonnée, ceux de la colonne 1, on peut admettre qu'entre les points qui servent à construire la courbe, les variations

sont rectilinéaires. Il suffit d'ailleurs de porter les points sur papier semi-logarithmique pour obtenir une droite. Il est donc possible de connaître avec une exactitude suffisante les valeurs de NV pour des valeurs mesurées de DS.

TABLEAU I. — Table de correspondance pour *B. abortus* 19.  
(NT = 1 milliard/ml.)

NV/NT	DURÉE DE DÉCOLORATION STANDARD (DS) en minutes
100/100 . . . . .	50
90/100 . . . . .	52
80/100 . . . . .	66
70/100 . . . . .	87
60/100 . . . . .	108
50/100 . . . . .	132
40/100 . . . . .	163
30/100 . . . . .	204
20/100 . . . . .	263
10/100 . . . . .	398

Les suspensions qui servent à dresser les tables sont standardisées de sorte que NT = 1 milliard/ml, afin que la décoloration soit lente et les valeurs de DS plus espacées. Il n'est cependant pas nécessaire de ramener à la concentration de 1 milliard/ml les suspensions à titrer, car on prolongerait à l'excès les temps de décoloration. Nous avons vu, en effet, que lorsque le rapport NT/NV reste constant, les variations de la durée de décoloration (D) sont inversement proportionnelles aux variations de NT. Pour toute suspension où NT est plus grand que 1 milliard/ml, la durée de décoloration standard (DS), correspondant à la suspension à 1 milliard/ml, est donnée par la formule :

$$DS = D \times NT$$

dans laquelle NT doit être exprimé en milliards/ml.

La valeur de NV lue sur le graphique ou le tableau en face de la DS ainsi calculée exprime le NV de la suspension en titrage.

*Exemple :* Pour une suspension telle que NT = 66 milliards/ml, la durée de décoloration mesurée (D) a été d'une minute. Si cette suspension était ramenée par dilution au titre standard de 1 milliard/ml, soit une réduction de concentration de 66 à 1, la durée de décoloration D serait portée d'une à soixante-six minutes, et D serait égal à DS. Le NV de cette suspension correspond donc, dans la table ou sur le graphique, à DS = 66. La suspension renferme 80 p. 100 de bactéries vivantes, soit 52 800 millions/ml.

TECHNIQUE DU TITRAGE. — 1° En partant d'une suspension bien homogène, déterminer la valeur de NT, par numération microscopique, ou néphélométrie.

2° Prélever 5 ml de suspension, et laisser quinze minutes au bain-marie à 37° C.

3° Placer au bain-marie une solution de bleu de méthylène à 1 p. 10 000, pendant quinze minutes.

4° A 5 ml de suspension, ajouter 1 ml de solution de bleu. Mélanger en retournant deux ou trois fois le tube bouché. Déposer en surface 0,5 ml d'huile de paraffine à 37°. Placer le tube au bain-marie, noter l'heure exacte.

5° Observer la décoloration, qui peut être très rapide si la suspension est très concentrée. Si la décoloration se produit trop vite pour que la durée puisse être exactement mesurée, recommencer les temps précédents après avoir dilué la suspension à 1/2 ou 1/3. Noter l'heure exacte où la décoloration est totale, et calculer la durée de décoloration (D) en minutes et dixièmes de minutes.

6° Effectuer :  $D \times NT$  (NT doit être évalué en milliards/ml). On obtient la valeur de DS.

Lire sur le graphique la valeur de NV correspondante.

Cette technique a été appliquée à des germes très divers : *Brucella abortus*, *E. rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *B. anthracis*, *E. typhosa*, *V. cholerae*. Des recherches actuellement en cours ont pour but de l'adapter au titrage des virus.

Une expérience de plusieurs années montre que les résultats obtenus concordent dans l'ensemble avec les numérations par cultures sur plaques de gélose, à condition que le nombre de ces cultures pour une dilution donnée soit au moins égal à 10.

## PRÉPARATION D'UN « PRINCIPE INDUCTEUR » DE LA TUMEUR DU *PELARGONIUM*

par P. MANIGAULT, M<sup>lle</sup> A. COMANDON et P. SLIZEWICZ.

(Institut Pasteur)

Des expériences récentes de Klein et Knupp [3] ont montré qu'il devait être possible d'induire des tumeurs de crown-gall avec des préparations exemptes de cellules bactériennes. Nous ne connaissons de ces travaux que la mention assez brève qui en est faite dans les *Brookhaven Symposia in Biology*, 1954, n° 6 :

« La bactérie virulente est cultivée dans des extraits de tissus de tiges de tomates qui ont été sévèrement blessées deux jours avant l'extraction.

Des cultures témoins sont faites dans des extraits de tissus « non blessés », ou encore en ajoutant au milieu à l'extrait de blessure, un précipitant connu de l'acide nucléique, le sulfate de protamine.

Après trois jours de croissance le milieu est stérilisé par filtration et introduit par des tubes dans des tiges de tomates décapitées. Beaucoup de plantes, traitées par le milieu de contrôle seul, développent des cals à la surface de la tige coupée. D'autres manifestent par la formation de racines la présence de substances de croissance élaborées par la bactérie dans le milieu. Dans ces expériences, 2 sur près de 200 plantes présentèrent des tumeurs *superficielles* typiques qui conte-



naient des bactéries virulentes, probablement dues au hasard d'une contamination de la plaie.

Les plantes traitées par le milieu stérilisé contenant des extraits de tissus blessés développent, *en dessous* de la surface décapitée, des tumeurs qui ne contiennent pas de bactéries. Une figure montre la greffe du tissu d'une de ces tumeurs stériles un mois après son implantation dans une tige de tomate. C'est le premier cas de l'induction d'une vraie tumeur sans contact de la bactérie avec les cellules qui doivent être transformées. »

Nous apportons une confirmation de ces résultats. Nous avons voulu contribuer à la détermination des conditions techniques à remplir pour la conduite d'une telle expérience tout en utilisant d'autres espèces végétales que la tomate : *Pelargonium zonale* L., variété Jardin des Plantes, et *Datura stramonium* L.

1° Traumatismes des plantes. On obtient des incisions régulièrement espacées et aisément reproductibles en employant un scarificateur d'un modèle connu — plusieurs lames de rasoir de sécurité séparées par des cales d'épaisseur déterminée (1 mm environ). On ne blesse que les trois ou quatre entre-nœuds les plus proches du sommet, sans utiliser les nœuds de la base des pétioles.

Pendant quarante-huit heures les plantes survivent dans la serre sans fanaison excessive des feuilles.

On ne récolte que les fragments de tige portant des blessures et on les broie au « mixer » sans adjonction de liquide (environ 250 cm<sup>3</sup> pour 20 plantes).

La préparation des germes s'effectue en quarante-huit heures de culture sur trois fioles de Fernbach agitées en permanence, contenant chacune 350 cm<sup>3</sup> de milieu Berthelot à 27°. Dans certaines expériences on marque les germes par <sup>32</sup>P (1). Les germes recueillis par centrifugation (5 500 t/m) sont lavés trois fois à l'eau physiologique. Le culot des tubes de centrifugation est mis en présence de 250 cm<sup>3</sup> d'extrait de blessure et agité pendant quarante-huit heures à 27° C.

2° Extraction. Le produit centrifugé à 5 500 t/m est stérilisé par filtration. La stérilité est contrôlée par ensemencement.

On pratique alors sur le liquide limpide stérile ainsi obtenu une purification par ultracentrifugation selon la technique utilisée pour les virus :

Une ultracentrifugation à 40 000 t/m pendant une heure (force centrifuge moyenne 105 400 g) dans l'ultracentrifugeuse Spinco donne un culot C<sub>1</sub> et un surnageant S<sub>1</sub>. Les culots C<sub>1</sub> des différents tubes sont remis en suspension dans un volume d'eau à 8,5 p. 1 000 de chlorure de sodium égal au 1/5 environ du volume initial.

Après un contact de quelques minutes, on centrifuge pendant vingt minutes à 10 000 t/m (force centrifuge moyenne 6 600 g).

Le surnageant S<sub>2</sub> que l'on recueille est soumis à une nouvelle ultracentrifugation à 40 000 t/m. Le culot C<sub>3</sub> se présente sous forme d'une pastille translucide qui se remet parfaitement en solution dans un volume d'eau salée égal au 1/100 du volume initial.

Les inoculations de la préparation initiale et de ses différentes frac-

(1) 0,2 cm<sup>3</sup> d'une solution à 100 µg de P par cm<sup>3</sup> dans chaque fiole. Activité environ 1 µC par cm<sup>3</sup> du milieu de culture.

tions s'effectuent dans les meilleures conditions en instillant à la pipette stérile quelques gouttes de liquide sous un lambeau de l'écorce découpé au bistouri par deux incisions parallèles, et écarté de la tige juste au moment de l'injection du liquide. On serre le tout par un pansement de cellophane stérile et on recouvre de sparadrap. Des échantillons de tous les liquides instillés sont mis en culture pour confirmer leur stérilité.

Le principe inducteur de la tumeur est mis en évidence :

1° Dans le liquide initial ;

2° Dans le culot de la première centrifugation  $C_1$  à 40 000 t/m mais *pas* dans le surnageant  $S_1$  ;

3° Dans le culot et le surnageant de la centrifugation suivante à 10 000 t/m ( $C_2$  et  $S_2$ ) ;

4° Dans le culot mais *pas* dans le surnageant de la centrifugation à 40 000 t/m ( $C_3$  et  $S_3$ ).

La stérilité des excroissances obtenues est vérifiée par ensemencement d'un broyat sur milieu de culture. Leur croissance est continue, ce qui les distingue déjà des cals auxiniques (pl.). Elles sont reproductibles *par greffe*, ce qui leur confère un caractère de tumeurs authentiques. Les instillations de liquides inactifs ne présentent pas d'excroissances appréciables.

L'aspect histologique des coupes est conforme à celui des tumeurs obtenues par inoculation bactérienne et la localisation de  $^{32}\text{P}$  par ascension dans la tige d'eau marquée par un radiophosphate disodique est la même dans les deux cas [4].

Des recherches sur l'origine et l'identité du principe inducteur de la tumeur sont en cours. Il semble que la préparation traitée par une désoxyribonucléase avant l'inoculation devienne inactive. Les tentatives faites pour suivre la destinée du radiophosphore de la préparation provenant de germes marqués au moment de la culture ont échoué ; la radioactivité résiduelle est trop faible pour être mesurée avec les moyens dont nous disposons.

Beardsley [4] a pu préparer récemment un phage produit par *Agrobacterium tumefaciens*. Ses expériences montrent que le surnageant de cultures d'*Agrobacterium tumefaciens*, filtré, stérile, contenant le phage, appliqué à des phloèmes de carotte en culture en présence

## LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Instillation du liquide initial : tumeur.

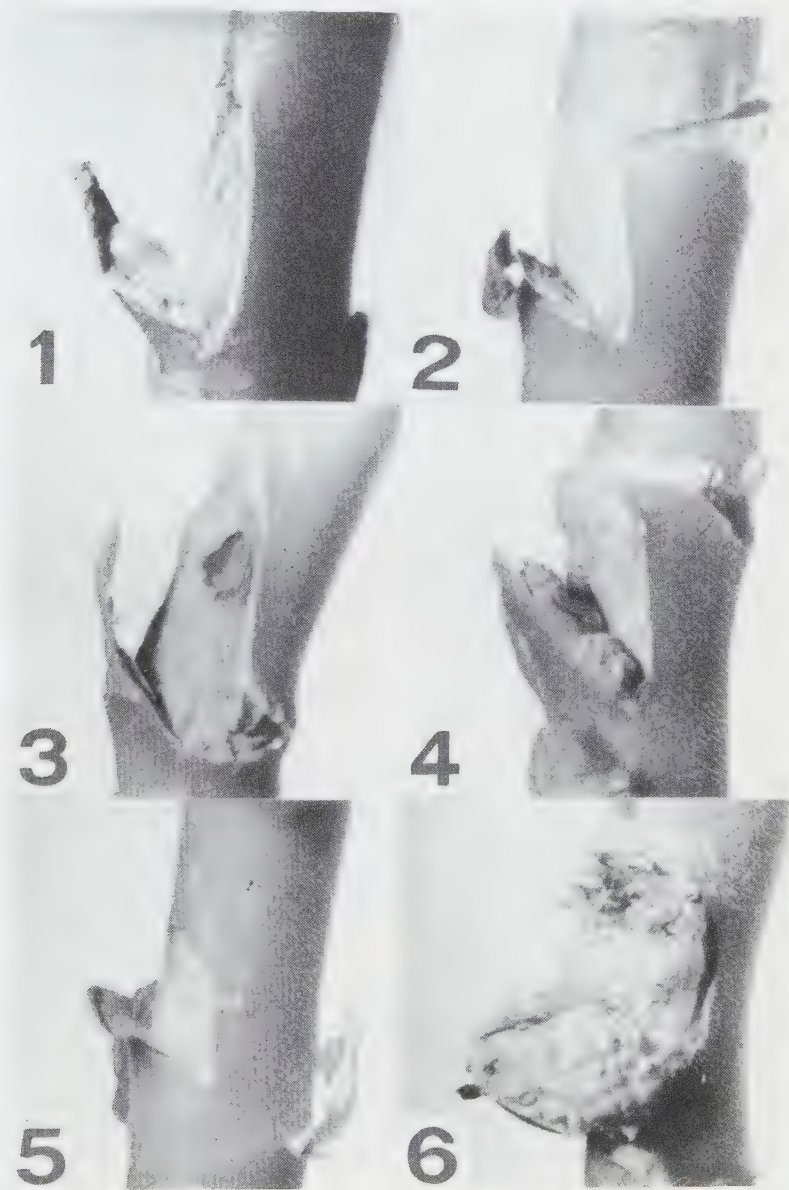
FIG. 2. — Instillation du surnageant  $S_1$  de la première centrifugation : pas de tumeur.

FIG. 3. — Instillation du surnageant  $S_2$  de la deuxième centrifugation : tumeur.

FIG. 4. — Instillation du culot de la deuxième centrifugation  $C_2$  : tumeur.

FIG. 5. — Instillation du surnageant  $S_3$  de la troisième centrifugation :  
pas de tumeur.

FIG. 6. — Instillation du culot  $C_3$  de la troisième centrifugation : tumeur.





de  $10^{-7}$  M acide indol  $\beta$  acétique est capable d'induire des proliférations que ne montrent pas les témoins. L'auteur se propose de déterminer si ces excroissances sont de vraies tumeurs, si elles sont induites par le phage présent dans les filtrats et si le phage a un rôle dans la période de transformation.

Etant donné les caractéristiques de la centrifugeuse utilisée, le fait que le principe inducteur sédimente totalement en une heure à 40 000 t/m permet de penser que — supposé sphérique et de densité 1,2 — il aurait un diamètre supérieur à 30 m $\mu$ .

Notons que la participation d'un acide nucléique à l'induction de la tumeur pourrait renforcer l'intérêt des résultats obtenus par Camus et coll. quant à la présence d'une protéine « étrangère » dans les tissus tumoraux de crown-gall cultivés *in vitro*. Cette protéine a été isolée par ultracentrifugation et électrophorèse (Camus [2]).

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEARDSLEY (S. E.). *The American Naturalist*, 1955, **89**, 175.
- [2] CAMUS (G.), WILDMAN (S. G.) et BONNER (J.). *Bull. Amer. Inst. biol. Sci.*, 1951 **4**, 34.
- [3] KLEIN (R. M.). *Brookhaven Symp. Biol.* 1953, **6**, 97. *Quart. Rev. Biol.* 1955, **30**, 207.
- [4] MANIGAULT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 602 ; 1954, **87**, 691.

## **ÉPREUVE DE VIRULENCE DE *S. PARATYPHI* A SUR EMBRYON DE POULET : SON APPLICATION A LA SÉRO-PROTECTION DES SUJETS IMMUNISÉS PAR LE VACCIN ANTI-TYPHO-PARATYPHOÏDIQUE**

par M<sup>me</sup> J. GRABAR et M<sup>me</sup> S. LE MINOR.

(Institut Pasteur, Service des Vaccins)

Dans un travail antérieur [1], nous avons rapporté nos résultats sur la virulence de *S. typhi* pour l'embryon de poulet. Poursuivant nos recherches sur le vaccin anti-typho-paratyphoïdique, nous nous sommes proposé d'étudier la virulence de *S. paratyphi* A en adoptant la même technique que celle utilisée pour *S. typhi*. Cette étude présentait un intérêt, en raison de la faible sensibilité de la souris à *S. paratyphi* A. Les résultats obtenus nous ont permis d'appliquer cette méthode à la recherche du pouvoir protecteur des sérums de sujets immunisés par le vaccin anti-typho-paratyphoïdique de l'Institut Pasteur.



SOUCHES DE *S. paratyphi* A. — Nous avons examiné 10 souches de *S. paratyphi* A isolées par hémoculture en Indochine, au Maroc et à Madagascar. Une seule a été isolée en France ; 7 de ces souches entrent dans la préparation du vaccin anti-typho-paratyphoïdique.

EPREUVE *in vitro*. — La recherche des antigènes de ces souches a été faite par agglutination sur lame et en tubes vis-à-vis des sérums anti-O et anti-H spécifiques, provenant du Centre des Salmonelles de l'Institut Pasteur. Toutes nos souches, complètes du point de vue antigénique, ont été agglutinées au titre homologue de ces sérums (O : 1/1 600 à 1/3 200 ; H : 1/25 600).

EPREUVE DE VIRULENCE SUR LA SOURIS. — Une suspension de chaque souche titrée à 400 millions de germes au centimètre cube a été injectée à la dose de 1 cm<sup>3</sup> par la voie intrapéritonéale, à un lot de 5 souris. Sur les 50 souris inoculées, 2 seulement sont mortes, le troisième jour. Nous avons isolé le germe du sang de l'une des souris et après avoir contrôlé le diagnostic de *S. para* A, nous l'avons réinjecté à un lot de 5 souris, par la même voie et à la même dose. Toutes les souris ont survécu après cinq jours d'observation.

EPREUVE DE VIRULENCE SUR L'EMBRYON DE POULET. — Cinq des dix souches ont été éprouvées sur l'œuf embryonné aux doses de 20, 200 et 2 000 germes au centimètre cube. La dose de 50 p. 100 a été pour quatre souches entre 20 et 200, c'est-à-dire entre 2 et 20 germes inoculés. Une seule souche (A 103) a tué entre 20 et 200 (DL<sub>50</sub>).

DISCUSSION DES RÉSULTATS. — L'étude des souches de *S. paratyphi* A que nous avons entreprise avait pour but de choisir celles qui pouvaient entrer dans la préparation du vaccin anti-typho-paratyphoïdique. Les 10 souches étudiées sont antigéniquement complètes, c'est-à-dire qu'elles possèdent les antigènes O : 1 et 2 et l'antigène H : a.

Dans l'article sur l'antigène Vi de *S. paratyphi* A, Felix [2] fait le choix de souches pour le vaccin en se basant sur leur agglutinabilité O et sur leur pouvoir pathogène pour la souris.

Les souches que nous avons étudiées sont agglutinées dans le sérum anti-O à des titres pratiquement identiques (1/1 600-1/3 200) et pas une des souches n'est pathogène pour la souris.

Felix mentionne le faible pouvoir pathogène de *S. paratyphi* A pour la souris et, en effet, avec des doses de 400 millions au centimètre cube, il n'obtient pas 100 p. 100 de mortalité pour les deux souches (H A 6 et 20606) qu'il considère fortement virulentes pour cet animal. Les mêmes souches, à la dose de 200 millions, ne sont pratiquement pas pathogènes pour la souris.

Mais 5 des 10 souches étudiées par nous sont virulentes pour l'œuf embryonné à des doses inoculées égales à celles de *S. typhi*.

Nos résultats nous ont permis de choisir deux souches : la souche A 212 qui tue l'embryon à la dose de 4 germes inoculés et la souche A 103 qui le tue à la dose de 30 germes inoculés.

La différence dans les DL<sub>50</sub> de ces deux souches pouvait laisser supposer une constitution antigénique différente. Nous avons immunisé

des lapins avec ces deux souches vivantes et avons repris les expériences de Felix [3] pour la recherche de l'antigène Vi de *S. paratyphi* A. La saturation de ces sérums avec les suspensions homologues traitées à l'acide chlorhydrique ne nous a pas permis d'envisager l'existence d'un tel antigène dans ces souches. Les deux sérums ont été complètement absorbés par les suspensions traitées à l'acide chlorhydrique. Kauffmann [4] n'a, de même, jamais pu mettre en évidence par cette technique un antigène qui serait l'antigène Vi de *S. paratyphi* A.

EPREUVE DE SÉRO-PROTECTION DES VACCINÉS. — *Matériel.* — Etant donné la grande sensibilité de l'embryon de poulet pour la souche A 212, c'est avec elle que nous avons effectué les épreuves de séro-protection.

Les sérums des vaccinés que nous avons éprouvés, provenaient de personnes immunisées par le vaccin anti-typho-paratyphoïdique A et B de l'Institut Pasteur, c'est-à-dire un vaccin tué à la chaleur, une heure à 56°, sans antiseptique. Le vaccin anti-paratyphoïdique A est incorporé dans le mélange à raison de 250 millions au centimètre cube.

Nous avons examiné la suspension paratyphoïdique A *in vitro* et *in vivo* suivant le protocole donné dans la publication sur le vaccin anti-typhoïdique [5]. Par les méthodes d'agglutination et d'hémagglutination, ainsi que par l'examen du surnageant et des germes lavés, nous avons pu constater que le vaccin contient les antigènes somatiques et que ces antigènes sont, en grande partie, en solution dans le surnageant. Les lapins immunisés ont répondu par la production des agglutinines O et H.

Pour l'épreuve de séro-protection des sérums humains, nous avons suivi la technique adoptée dans notre travail sur le pouvoir protecteur anti-typhoïdique de sérums humains [6].

*Résultats.* — Les 10 sérums de personnes vaccinées à des dates différentes ont protégé l'embryon de poulet contre la souche *S. paratyphi* A 212 à des doses ( $DL_{50}$ ) de 100 à 300 germes inoculés, la dose  $DL_{50}$  des témoins étant de 4 germes inoculés. Ces résultats montrent que l'on peut appliquer la méthode sur embryon de poulet pour déterminer le pouvoir protecteur anti-paratyphoïdique A des sérums humains. La spécificité de la réaction a été établie par l'absence de pouvoir protecteur de deux sérums provenant de deux enfants non vaccinés et convalescents d'une infection à *E. coli* 111 : B4 et qui protégeaient l'embryon de poulet vis-à-vis de ce germe.

#### RÉSUMÉ.

La virulence de *S. paratyphi* A, et le pouvoir protecteur de sérums d'individus vaccinés par le vaccin TAB contre une infection à *S. paratyphi* A, ont été étudiés sur embryon de poulet. Alors que *S. paratyphi* A n'est pas pathogène pour la souris, elle l'est pour l'embryon de poulet, ce qui permet d'effectuer les épreuves de séro-protection vis-à-vis de cette salmonelle.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRABAR (M<sup>me</sup> J.) et LE MINOR (M<sup>me</sup> S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 528.
- [2] FELIX (A.). In *J. Hyg.*, 1952, **50**, 510.
- [3] FELIX (A.). In *J. Hyg.*, 1952, **50**, 515.
- [4] KAUFFMANN (F.). In *Acta path. microbiol. scand.*, 1953, **32**, 574.
- [5] GRABAR (M<sup>me</sup> J.) et LE MINOR (M<sup>me</sup> S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 601.
- [6] GRABAR (M<sup>me</sup> J.) et LE MINOR (M<sup>me</sup> S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 239.

## EFFET DE LA CARENCE TOTALE EN VITAMINE B6 SUR LA MULTIPLICATION DU BACILLE TUBERCULEUX CHEZ LE RAT BLANC

par M<sup>me</sup> F. CHARCONNET-HARDING et A. HIRSCH.

(Laboratoire de la Clinique de la Tuberculose  
[professeur ETIENNE BERNARD],  
avec le concours du Laboratoire de Biochimie de la Nutrition  
du C. N. R. S.) [Bellevue].

L'importance des facteurs nutritionnels, et notamment des apports vitaminiques sur l'évolution de la tuberculose expérimentale, a été étudiée à maintes reprises en examinant l'action de ces facteurs sur la mortalité des animaux et l'étendue des lésions. Nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de la carence en pyridoxine en utilisant un test quantitatif : la numération des bacilles tuberculeux dans les organes du rat albinos.

CONDITIONS ET TECHNIQUE EXPÉRIMENTALES. — Le régime de base était totalement privé de vitamine B6, mais complet et équilibré par ailleurs. Il avait la composition suivante par kilogramme de poudre sèche : caséine dévitaminée, 140 g ; mélange salin, 40 g, huile de tournesol, 10 g ; margarine, 90 g ; cystine, 1 g ; sucre, 690 g ; mélange vitaminique incorporé à la caséine (1), 10 g ; cellulose, 20 g. A 1 kg du mélange on ajoute 5 cm<sup>3</sup> de solution de biotine à 40 cm<sup>3</sup>, 5 cm<sup>3</sup> de solution de choline à 20 p. 100 et 250 cm<sup>3</sup> d'eau. Les vitamines A et D sont apportées sous forme de « vitadone » (2) à raison de 11 gouttes par semaine.

Les lots ont été composés de la façon suivante : 25 rats mâles pesant en moyenne 65 g ont été mis au régime carencé ; 17 rats de poids comparables ont reçu le régime de base supplémenté en pyridoxine (5 mg par kilogramme sec). Les animaux, placés en cages individuelles, mangeaient à volonté.

(1) Mélange vitaminique, par kg de soupe : thiamine : 4 mg, acide nicotinique : 40 mg, acide folique : 400 mg, riboflavine : 6 mg, pantothénate de calcium : 40 mg, caséine : 10 g.

(2) La vitadone contient 120 000 U.

Pour l'inoculation, on a utilisé une culture de 6 jours de bacilles tuberculeux humains (souche H<sub>37</sub>Rv) en milieu de Dubos. L'inoculation a été faite par voie intrapéritonéale avec 0,002 mg d'une suspension de bacilles dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique contenant 0,1 p. 100 d'albumine bovine. La numération a montré que cette dose correspondait à 140 000 bacilles vivants.

Après sacrifice des animaux, on a prélevé le foie et la rate qui ont été pesés stérilement. Puis les organes ont été broyés avec du carborundum, en totalité dans le cas de la rate et à raison de 2 g environ pour le foie. Pour la numération bacillaire, nous avons utilisé une technique dérivée de celle de Dubos. Les broyats sont émulsionnés dans une solution d'albumine bovine à 0,1 p. 100 additionnée de 10 unités de pénicilline par centimètre cube sous un volume tel que 1 cm<sup>3</sup> d'émulsion corresponde à 0,1 g d'organe. On procède à des dilutions successives de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-4</sup>. On ensemence 0,05 cm<sup>3</sup> de chacune de ces dilutions, d'une part sur milieu de Löwenstein-Jensen en tubes, d'autre part sur milieu gélosé de Dubos en boîtes de Petri. Des lectures successives sont faites du quinzième au quarante-cinquième jour et l'on retient le chiffre maximum des colonies correspondant à chaque dilution, d'où l'on déduit la richesse de l'émulsion initiale et par là même, celle des organes entiers.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — Nous avons procédé à deux séries d'essais. Dans les deux cas, les animaux ont été inoculés six semaines après la mise aux régimes expérimentaux (régime de carence B6 et régime complet). Par contre, la durée de l'infection tuberculeuse a varié d'un essai à l'autre.

EXPÉRIENCE n° 1 : *Durée moyenne de l'infection : vingt-deux jours.*

— Au moment de l'inoculation, les rats témoins avaient un aspect normal alors que les animaux carencés en pyridoxine accusaient les signes cliniques de la carence B6 : dermite des pattes, des oreilles et des narines (acrodynie) et œdème rougeâtre des paupières.

Aucun animal n'est mort spontanément et tous ont été sacrifiés du vingtième au vingt-quatrième jour après l'inoculation. Les résultats relatifs à la croissance des animaux et à la multiplication bacillaire sont résumés dans le tableau I.

EXPÉRIENCE n° 2 : *Durée de l'infection : cinquante-six jours.* — Au moment de l'inoculation, l'état des animaux est le même que précédemment : aspect normal des témoins, signes cliniques d'avitaminose B6 chez les carencés. Aucun animal n'est mort spontanément et tous ont été sacrifiés du cinquante-quatrième au cinquante-huitième jour après l'inoculation. Les résultats relatifs à la croissance des animaux et à la multiplication bacillaire sont résumés dans le tableau II.

DISCUSSION DES RÉSULTATS. — En analysant les valeurs numériques, fournies par la première expérience, relatives au nombre de bacilles contenus dans 100 mg de rate, nous constatons qu'elles varient chez les témoins de 500 à 2 600, tandis que chez les carencés elles varient de 6 000 à 360 000, les valeurs moyennes étant de 1 600 chez les témoins contre 93 000 chez les carencés.

TABLEAU I.

<u>Croissance</u>					
Lot	Nbre d'animaux	Poids moyen au départ (grs.)	Poids moyen à l'inoculation (grs.)	% d'accroissement en 6 semaines	Poids à l'autopsie (grs.)
Témoins	10	65	155	138	184
Carencés	14	65	118	81	115

<u>Nombre de bacilles</u>				
Lot	<u>RATE</u>		<u>FOIE</u>	
	Pour 0,1 g	Pour 1'organe entier	Pour 0,1 g	Pour 1'organe entier
Témoins	1.600	12.000	400	26.000
Carencés	93.000	470.000	6.000	450.000

TABLEAU II.

<u>Croissance</u>					
Lot	Nbre d'animaux	Poids moyen au départ (g)	Poids moyen à l'inoculation (g)	% d'accroissement en 6 semaines	Poids à l'autopsie (g)
Témoins	9	68	176	160	240
Carencés	11	73	130	78	130

<u>Nombre de bacilles.</u>				
Lot	<u>RATE</u>		<u>FOIE</u>	
	Pour 0,1 g	Pour 1'organe entier	Pour 0,1 g	Pour 1'organe entier
Témoins	180	1.400	2.400	42.000
Carencés	220.000	1.400.000	480.000	6.600.000



L'effet du régime déficient ne s'est pas limité à l'intensité de la multiplication ; le régime a agi également sur la durée de la phase logarithmique de croissance active. En effet, les résultats des travaux de Wessels [4] (que nous avons retrouvés dans des expériences antérieures) ont montré qu'en fonction du temps, le nombre des bacilles tuberculeux humains dans la rate des rats passe par un maximum dans les premières semaines après l'inoculation, puis décroît régulièrement. Cette allure habituelle de la courbe se retrouve nettement chez nos animaux témoins : le nombre des bacilles est en effet plus élevé après vingt-deux jours qu'après cinquante-six jours d'inoculation ; les chiffres pour la rate sont respectivement de 1 600 à 170 bacilles pour 100 mg d'organe et de 12 000 à 1 400 bacilles pour la rate entière. A l'inverse le nombre des bacilles mesuré chez les animaux carencés est plus élevé après cinquante-six jours d'infection qu'après vingt-deux jours. Dans ce cas les valeurs pour la rate sont, par 100 mg d'organe, de 93 000 le vingt-deuxième jour et de 220 000 le cinquante-sixième jour. Les valeurs correspondantes pour l'organe entier sont de 470 000 et de 1 400 000.

Bien que ces résultats aient été obtenus avec un régime totalement privé de pyridoxine, il serait néanmoins prématuré d'attribuer cet effet à la seule avitaminose B<sub>6</sub>. On sait que toutes les carences, même les plus spécifiques, agissent sur l'appétit des animaux et diminuent la quantité des aliments ingérés, créant ainsi un véritable état d'hyponutrition. Cette règle s'est confirmée dans nos essais. La moyenne de consommation par animal et par jour au moment de l'inoculation était de 8,7 pour les animaux carencés tandis que pour les animaux témoins elle était de 15 g. Le jour précédant le sacrifice des animaux, cette consommation était respectivement de 9,2 et 14,7 g dans la première expérience et de 13 et 17,2 dans la deuxième expérience. Il n'est donc pas exclu que la prolifération bacillaire accrue des animaux soumis au régime de carence soit en partie attribuable à la restriction alimentaire.

CONCLUSION. — Après inoculation, la multiplication du bacille tuberculeux, évaluée par une méthode quantitative, est beaucoup plus importante chez les rats soumis à un régime privé de vitamine B<sub>6</sub> que chez les témoins soumis à un régime équilibré.

#### BIBLIOGRAPHIE

[4] WESSELS (C.C.) *Am. Rev. Tub.*, 1941, **43**, 459.

## TECHNIQUE NOUVELLE D'HOMOGENÉISATION RAPIDE POUR LA RECHERCHE DU B. K. DANS LES CRACHATS ET PRODUITS DE TUBAGES GASTRIQUES

par J. DUBREUIL, B. VASSALO et M. BOURGAIN.

(Laboratoire de la Santé publique de la 1<sup>re</sup> Région de Tunisie)

Nombreuses sont les méthodes et les techniques d'enrichissement proposées et utilisées pour la détection du B. K. dans les produits organiques bacillifères ou suspectés de l'être.

La technique proposée est basée sur la fluidification rapide de produits organiques sous l'action d'une solution d'hypobromite de soude (1), solution comparable à celle utilisée pour le dosage de l'urée par gazométrie.

Cette technique a pour avantage d'être rapide et de se prêter facilement à l'exécution d'examen en série, avantages précieux pour les centres de dépistage, les hôpitaux, les sanatoriums et aussi pour le contrôle de certaines médications en cours ou en phases expérimentales.

### TECHNIQUE.

#### *Préparation de l'hypobromite de soude.*

#### I. SOLUTION MÈRE :

<i>Solution A :</i>	Bromure de potassium .....	82 g.
	Chlorate de potasse .....	17 g.
	Eau distillée .....	200 cm <sup>3</sup> .
<i>Solution B :</i>	HCl pur .....	80 cm <sup>3</sup> .
	Eau distillée .....	80 cm <sup>3</sup> .
	Placer cette solution en matras de .....	500 cm <sup>3</sup> .

Dès que la solution A arrive à ébullition, la jeter sur la solution B. Boucher sommairement au liège le flacon mélangeur et le plonger *sans tarder* au bain-marie pour refroidissement.

Répartir cette solution en flacons bouchés à l'émeri, tout en ayant soin d'effectuer cette opération au grand air.

Signalons à titre indicatif que la solution d'hypobromite préparée au brome pur d'après les données classiques répond au même but :

Brome pur .....	8,5 cm <sup>3</sup> .
Bromure de potassium .....	50 g.
Eau distillée .....	82 cm <sup>3</sup> .

(1) Khouri, en 1924, avait préconisé également l'hypobromite de soude.

## II. SOLUTION D'EMPLOI :

Au fur et à mesure des besoins, faire le mélange suivant :

Brome (solution mère) .....	{	a a (parties égales).
Lessive de soude dédoublée .....		

Cette solution en récipient bien bouché se conserve bien.

## MODE D'EMPLOI.

1° MATÉRIEL NÉCESSAIRE. — Hypobromite de soude (solution d'emploi). Ether. Tubes à hémolyse (70 × 12 de préférence). Bouchons caoutchouc pour tubes à hémolyse. Tubes à essai 180 × 18. Bouchons de caoutchouc pour tubes de 180 × 18. Centrifugeuses.

Après usage, la verrerie sera plongée vingt-quatre heures dans une solution sulfochromique, puis bien rincée.

2° Selon l'aspect du produit organique, répartir en tubes à essai, au jugé, les volumes suivants :

a) *Crachats salivaires et liquides gastriques* (produits organiques, 3 ; hypobromite, 1).

b) *Crachats muco-purulents* (crachats, 3 ; hypobromite, 2).

c) *Crachats purulents épais* (crachats, 2 ; eau, 3 ; hypobromite, 3).

Boucher les récipients d'épreuve (tubes à essai) et brasser vivement pendant quelques secondes. Laisser reposer le mélange *pendant une durée d'au moins vingt minutes* (le contact peut être prolongé sans inconvénient pendant plusieurs heures).

Répartir les produits homogénéisés en tubes à hémolyse en remplissant chaque tube au deux tiers et y ajouter *1 cm<sup>3</sup> d'éther*.

Bien boucher les tubes à hémolyse au bouchon de caoutchouc et agiter chaque tube vivement pendant dix secondes environ.

Déboucher les tubes à hémolyse, puis *centrifuger pendant cinq minutes* (avoir soin de placer les bouchons en récipient capable de supporter la stérilisation, entre autres une ébullition de dix minutes en solution légèrement sodée).

A la sortie de la centrifugeuse, on constate dans les tubes à hémolyse :

a) En surface, un liséré clair (reste d'éther) ;

b) Une couche inférieure jaune clair ;

c) Entre ces deux zones, un disque plus ou moins opaque, qui représente la partie à prélever. Ce disque est constitué par des corps gras entraînés par l'éther.

Pratiquer l'étalement sur lames. Incliner le tube à hémolyse à 45° environ et, à l'aide d'une anse de platine, amener le disque sur le bord du tube ; en prélever une ou deux anses pour étalement en couche mince.

A partir du tube à hémolyse, une seconde technique d'étalement peut être utilisée.

Laisser évaporer totalement l'éther (le centimètre cube d'éther utilisé par tube est en effet la quantité minimum pouvant être évaporée en majorité au cours des cinq minutes de centrifugation). Les éléments gras sont précipités en culot. A la sortie de la centrifugeuse, s'il

existe en surface un voile, le prélever à l'anse ; à défaut, vider et éponger le tube à hémolyse tout en conservant le culot de centrifugation qui sera étalé sur lames en couches minces.

#### COLORATION.

Quelques difficultés dans les manipulations de décoloration ont dû être surmontées. Les acides forts en solution aqueuse décolent les étalements et même la méthode de Kühne-Borel, moins brutale, laisse colorés certaines graisses ou savons. Après divers tâtonnements, l'alcool acidifié à l'acide azotique, à raison de 100 parties d'alcool pour deux parties de  $\text{NO}_3\text{H}$ , a été retenu en raison de son action rapide. Il est recommandé de préparer le mélange acide-alcool au moment de l'emploi, car il pourrait se produire par la suite des dégagements de vapeurs nitreuses, le mélange donnant une réaction exothermique.

#### MÉTHODE DE COLORATION RECOMMANDÉE.

Sécher le frottis (à l'étuve de préférence) et le plonger dix minutes dans le mélange suivant :

Alcool à 90° .....	90 cm <sup>3</sup> .
Acide acétique .....	100 cm <sup>3</sup> .

Ce bain a pour but d'éliminer les chlorures et la soude libre entraînés au cours de l'homogénéisation.

Egoutter. Laisser sécher et compléter la fixation à la chaleur.

Colorer à la fuchsine (technique classique). Laisser refroidir. Sans laver, recouvrir la lame d'alcool azotique pendant dix secondes.

Laver sous faible pression, la lame tenue horizontalement. Terminer la décoloration avec quelques gouttes d'alcool azotique, puis laver comme précédemment.

Colorer le fond avec une solution de bleu de méthylène au 1/300. Laver. Sécher. Examiner.

Le B. K. se détache en rouge vif sur fond bleu pâle. Les bacilles sont plus nombreux à la périphérie que dans le reste du frottis (ne pas omettre l'examen de cette région).

L'utilisation de cette technique doit permettre l'homogénéisation, la centrifugation et la coloration de 20 échantillons organiques en quatre-vingt-dix minutes.

Un phénomène observé dans certains échantillons, et tout particulièrement dans les crachats de tuberculeux, mérite d'être signalé. Certains d'entre eux, après deux heures de contact avec la solution d'emploi, conservent définitivement la teinte initiale (souvent accentuée) du mélange hypobromite, phénomène non spécifique, mais qui doit attirer l'attention.

Il faut signaler de plus que les crachats, après un contact de quinze minutes avec l'hypobromite, ne tuberculisent plus le cobaye.

## ÉTUDE DU POUVOIR BACTÉRICIDE ET DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DE LA GELÉE ROYALE

par H. HINGLAIS M. HINGLAIS et JEAN GAUTHIERIE.

(Faculté de Médecine de Paris)

Ayant observé, à l'occasion d'un autre travail, que des échantillons de gelée royale pure, d'origine contrôlée et non additionnée de substances antiseptiques, recueillis sans précautions d'asepsie spéciales et conservés dans du matériel non stérilisé (verre et liège) donnaient néanmoins sur les milieux courants des ensemencements *stériles*, il nous a paru intéressant d'étudier méthodiquement ce phénomène que ne présentent ni le miel, ni la bouillie gastrique réservée aux larves ordinaires.

Nous avons étudié, d'une part, le pouvoir bactéricide et, d'autre part, le pouvoir antibiotique de la gelée royale.

I. ÉTUDE DU POUVOIR BACTÉRICIDE DE LA GELÉE ROYALE. — *Principe* : Après avoir laissé un germe vivant en contact avec la gelée royale pendant un temps déterminé, le mélange est ensemencé en milieu nutritif. On a employé le staphylocoque doré et *Proteus vulgaris*.

Les essais sont effectués en mettant en contact, pendant des temps variables, parties égales de gelée royale et de milieu de culture en bouillon nutritif (culture de vingt-quatre heures contenant environ 20 milliards de germes par centimètre cube). Une goutte de ce mélange est ensemencée après les délais indiqués ci-dessous dans 2,5 cm<sup>3</sup> de bouillon peptoné glucosé. 1 goutte de gelée royale pure et 1 goutte de culture pure diluée au demi sont ensemencées simultanément et servent de témoins.

Le tableau I groupe les résultats obtenus.

*Conclusion* : La gelée royale, mise en contact avec une suspension microbienne, exerce un pouvoir bactéricide certain.

Sur le staphylocoque, la culture est nettement ralentie après un contact de cinq à trente minutes avec la gelée royale et plus nettement encore après un contact d'une à trois heures. Enfin, un contact de six heures semble avoir tué définitivement tous les germes.

Sur le *Proteus*, l'action est encore plus nette et l'on observe dès la quinzième minute de contact une stérilisation pratiquement totale de la suspension microbienne.

II. ÉTUDE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DE LA GELÉE ROYALE. — *Principe* : Un germe vivant est ensemencé à une concentration déterminée dans un milieu nutritif contenant des doses croissantes de gelée royale.

Les essais sont effectués en bouillon peptoné glucosé, à raison de 2,5 cm<sup>3</sup> de milieu par tube. Les souches utilisées dans ces expériences sont des souches pathogènes de staphylocoque doré et de *Proteus*



TABLEAU I.

Durées de contact	Résultats				Morphologie après coloration de Gram
	Cultures				
	6h.	24h.	48h.	96h.	
a) Staphylocoque	-	-	-	-	
Témoin gelée royale	+	++			normale
Témoin culture	±	++			d°
1 minute	±	++			d°
2 minutes	-	++			d°
5 minutes	-	++			d°
15 minutes	-	++			d°
30 minutes	-	++			d°
1 heure	-	-	++		d°
2 heures	-	-	++		d°
3 heures	-	-	++		d°
6 heures	-	-	-	-	
b) Proteus	-	-	-	-	
Témoin gelée royale	+	++			normale
Témoin culture	±	++			d°
1 minute	±	++			d°
2 minutes	-	++			d°
5 minutes	-	++			d°
15 minutes	-	-	-	-	
30 minutes	-	-	-	-	
1 heure	-	-	-	-	
2 heures	-	-	-	-	
3 heures	-	-	-	-	
6 heures	-	-	-	-	

TABLEAU II.

Nbre de germes ensemencés par cm <sup>3</sup>	gelée royale		Cultures				Morphologie après colo- ration de Gram
	Quantité ab- solue par tu- be	Concen- tration par cm <sup>3</sup>	24h.	48h.	6j.	15j.	
a) <i>Staphylocoques</i>							
0 (témoin gelée)	1,25mg	0,5mg	nég.	nég.	nég.	nég.	normale
2x10 <sup>8</sup>	1,25	0,5	++				normale
2x10 <sup>8</sup>	2,5	1	++				"
2x10 <sup>8</sup>	5	2	++				"
2x10 <sup>8</sup>	10	4	++				"
2x10 <sup>8</sup>	50	20	++				"
2x10 <sup>8</sup>	100	40	++				"
2x10 <sup>8</sup> (témoin culture)	0	0	++				normale
b) <i>Proteus</i>							
0 (témoin gelée)	1,25mg	0,5mg	nég.	nég.	nég.	nég.	
2x10 <sup>8</sup>	1,25	0,5	++				normale
2x10 <sup>8</sup>	2,5	1	++				"
2x10 <sup>8</sup>	5	2	++				"
2x10 <sup>8</sup>	10	4	++				"
2x10 <sup>8</sup>	50	20	++				"
2x10 <sup>8</sup>	100	40	++				"
2x10 <sup>8</sup> (témoin culture)	0	0	++				normale

Les essais avec 50 et 100mg par tubes ont été faits  
en double avec les mêmes résultats.

*vulgaris*. Pour chaque tube le nombre de germes ensemencés est d'environ  $2 \times 10^8$  par centimètre cube (200 millions). Le tableau II groupe les résultats obtenus.

*Conclusion.* — La gelée royale ne semble pas avoir de pouvoir *antibiotique* sur les deux espèces microbiennes essayées.

Même à une concentration relativement très élevée, jusqu'à 100 mg par tube de culture, on n'a pas observé d'empêchement de la prolifération ni du staphylocoque, ni du *Proteus* dans les expériences qui ont été faites avec l'échantillon.

En revanche, il est confirmé par l'observation du « témoin gelée », dans ces expériences, que la gelée royale se conduit comme un milieu stérile. Ceci confirme, en somme, les conclusions qui nous sont données dans la première expérience au sujet du pouvoir *bactéricide* de la gelée royale.

*CONCLUSION GÉNÉRALE.* — La gelée royale présente un pouvoir bactéricide certain. Elle ne semble pas présenter, en revanche, de propriété antibiotique au sens habituel du terme, sur les deux souches microbiennes en expérience.

## PRÉCISIONS SUR LE SYSTÈME PLAQUETTES-HÉMOCONIES ET APERÇU DU RÔLE DES PRODUCTIONS PLAQUETTAIRES DANS LA DÉFENSE PASSIVE TOXI-INFECTIEUSE

par L. DUCHON.

(Laboratoire de Secteur de l'Hôpital Trousseau)

Précédemment [1], nous avons exposé certaines particularités concernant plaquettes et hémocories dans l'édification de la défense passive contre l'infection. Nous les avons considérées comme éléments d'un même organisme parce que reliées l'une à l'autre par un dispositif filamenteux. Toutefois, ce système bâti sur une patiente observation, d'aucuns auraient pu l'accuser d'être plus subjectif qu'objectif et si, à l'époque, une photographie avait matérialisé le système, la difficulté à la reproduire pouvait à bon droit laisser suspecter l'artefact. Depuis, nous sommes parvenu avec simplicité à préciser ce qu'est le système plaquettaire et à apporter de ce fait plus de clarté dans l'organisation défensive.

*TECHNIQUE.* — Les sangs sont recueillis sur citrate à raison de 0,3 cm<sup>3</sup> de solution à 10 p. 100 pour 10 cm<sup>3</sup> de sang. Deux heures de décanation. Observations exclusives entre lame et lamelle surélevée.

En vue de la densité de plaquettes à obtenir, on utilise : soit une anse de 4 mm de diamètre d'un fil de platine de 5/100 de millimètre, soit une anse de 7 mm de diamètre d'un fil de 20/100 et, pour que les plaquettes soient réparties au mieux et non traumatisées (important surtout du point de vue de leur physiologie), on procède comme suit.

On utilise cette solution de citrate que l'on dilue encore à 1 p. 15 d'eau distillée.

Sur la lame, on en porte et étale une gouttelette dans une cellule ronde. Puis, on prélève un film de sérum en y trempant verticalement l'anse choisie. L'anse disposée alors horizontalement, on laisse tomber sur le film une autre gouttelette de la dilution d'une hauteur de 1 ou 2 mm. Elle y reste suspendue. On la porte et on la répartit délicatement dans la gouttelette de la cellule et on retire l'anse toujours verticalement afin d'obtenir des répartitions équivalentes. On recouvre d'une lamelle. On lute avec soin.

Quel que soit le sang, immédiatement et allant se précisant d'heure en heure, le système plaquettaire se révèle dans toute sa netteté.

*Anse de 4 mm.* — Les plaquettes sont isolées, elles peuvent être étudiées en détail. Ce qui d'emblée s'impose, c'est précisément le dispositif filamenteux : les antennes de la plaquette. Ces antennes, qui émanent de la plaquette munie de ses dendrites, d'une très grande finesse au contraste de phase, sont d'un bel éclat jaune sur fond noir. Elles sont plus ou moins longues, 20 à 30  $\mu$  environ, mais peuvent atteindre une centaine de  $\mu$ . Ce qui n'est pas sans expliquer leur altération et l'impossibilité que nous avons précisée de leur observation entre lame et lamelle non surélevée. Le fait de leurs dimensions, de leur morphologie, de leur apparition immédiate sans artifices, nous paraît exclure toute possibilité d'artefact en particulier dû à la rétraction de l'hyalomère.

L'antenne peut être simple ou composée.

Simple : elle est un appareil filiforme, la plaquette peut en porter une seule ou plusieurs, elle rappelle alors l'aspect de variétés d'échinodermes tant le nombre est variable. Elle peut être filiforme jusqu'à son extrémité qui s'effile encore ou qui peut porter soit une sphérule, soit une formation dont la ressemblance fait penser à une « plaquette fille » plus petite, à dendrites plus nombreuses, plus fines ; soit un renflement unique, creux, en épi de blé subterminal. Parfois des renflements se disposent le long de l'antenne et lui donnent un aspect moniliforme.

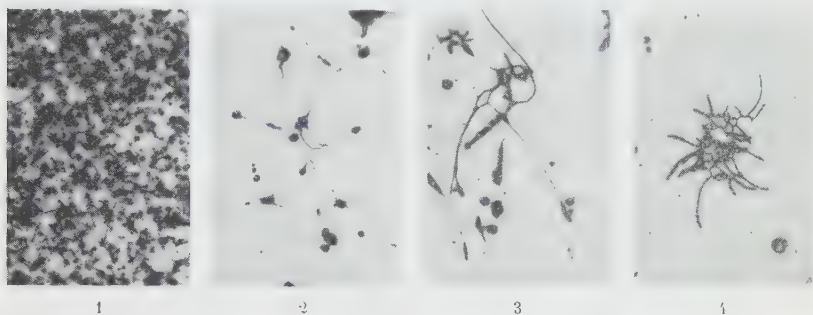
Composée : cette antenne qui a tendance à faire partie du gigantisme plaquettaire que montrent certains sérums peut être encore unique ou multiple. Tantôt elle porte des ramifications en nombre variable, sorte de rameaux fructifères terminés soit par une sphérule, soit par une « plaquette fille », soit tronqués comme si le fruit était tombé. Par fragilité ou évolution plus probable, souvent on remarque que des « plaquettes filles » et des sphérules voguent librement, certaines remorquant un appendice plus ou moins effilé, et cette « fructification » peut être fort abondante jusqu'à donner au champ un aspect particulier de lâcher de ballonnets. Tantôt des ramifications réunissant les bases des antennes d'une plaquette tissent autour d'elle une « toile d'araignée ».

Les antennes sont souples, elles sont animées de mouvements trépidants, oscillants, voire de reptation.

L'aspect de nos préparations est donc bien différent de celui obtenu avec les solutions usuelles d'étude des plaquettes. Il a suffi d'une dilution particulière du citrate (sans doute influence de la teneur en électrolyte, commune dans le domaine sérique) pour que le système plaquettaire apparaisse.

Ainsi apparu, ce système rappelle le végétal qui pousse vers le haut, la plaquette restant longtemps sur un plan inférieur à celui de ses productions.

Dimensions, aspect, complexité ne sont pas sans évoquer : la fragilité, ce qui explique la nécessité de la pratique décrite excluant tout transport par pipettes ; la sensibilité, la seule présence de l'électrolyte qui a pour effet de gonfler et stabiliser l'appareil entraîne des pertur-



1. Gr. 140 : plaquettes, antennes, productions.
2. Gr. 880 : plaquette à antennes fructifères.
3. Gr. 880 : antennes géantes portant « épis de blé » et au voisinage 3 corpuscules.
4. Gr. 880 : plaquette à « toile d'araignée ».

bations telle l'absence de formation de filaments fibrineux même sous l'action d'une coagulase, insolite pour un sérum citraté dilué à ce taux, telle la disparition de l'intense activité anti-microbienne que nous préciserons de ces productions plaquettaires. Mais, ainsi « fixé », indéfiniment l'appareil garde son individualité morphologique.

Anse de 7 mm. — La densité des thrombocytes aboutit souvent ici à l'enchevêtrement des antennes (leur trop grand nombre nuit toute-fois à l'apparition de celles-ci). Remarquons tout d'abord que cet enchevêtrement, observé en particulier sur les amas collés à la lamelle, révèle schématiquement : l'organisation des houpes-festons, du film (1) par enmêlement souple, visqueux, et aussi l'armature du réseau fibrineux, le tout constituant la barrière de défense contre

(1) L'apparition de ces formations est assez capricieuse, longueur et abondance des antennes commandant l'épaisseur de la cellule, le tissu plastique ne dépassera pas huit centièmes de mm. Elle est plus constante vers  $+5^{\circ}$ .

l'infection [2]. On observera que sur fond noir, le filament « fibreux » garde l'aspect coloré de l'antenne, est tubulaire comme elle.

L'antenne, en effet, nous semble être un organe creux. Dans les préparations, il n'est pas rare de l'observer. De plus, elle est ponctuée souvent de corpuscules, bien visibles sur les photographies, qui paraissent faire partie d'une circulation. Il nous est arrivé d'observer particulièrement, après coloration vitale par le bleu de méthylène, que des granulations gonflées, parties de la plaquette se déplaçaient le long de l'antenne alors largement tubulaire avec parfois mouvements de 'udion, artefact sans doute, mais artefact témoin.

Cette circulation ne nous semble pas sans relation avec ces granulations qui occupent les sphérules, les « plaquettes filles » qui semblent augmenter en nombre et gravitent avec intensité au contact des micro-organismes sous l'influence toxique, ni surtout avec ce corpuscule souvent à la limite de la visibilité qui ponctue à leurs extrémités nombre d'antennes filiformes, et qui est là de passage. De là, en effet, il nous semble être éjecté en une hémococonie dans le milieu ambiant, mais non libéré immédiatement car retenu par un filament invisible. Dès lors les mouvements browiens violents de cette hémococonie sont transmis, et les impulsions ainsi provoquées de l'antenne rappellent étrangement celles du scion relié à la bête qui se débat entre deux eaux. Rien ne dit que cette hémococonie reste unique et qu'un « attelage » ne puisse se constituer. Ultérieurement, nous montrerons l'apparition de cette liaison filamenteuse sous une influence toxi-infectieuse. Pour l'instant nous pouvons étayer le bien-fondé de ce système par les observations suivantes :

a) Plus dans un sérum les hémococonies sont nombreuses, plus les antennes sont mobiles. La réciproque est vraie.

b) Quand, au moyen d'une coagulase, on observe la « solidification » des antennes, leur perte de mobilité suit la progression de la disparition des « hémococonies ». De plus, l'antenne, comme si elle exprimait la multiplicité des éjections hémococoniales, peut alors se montrer bifide ou empennée.

c) Sur une préparation âgée, on peut avoir la chance d'observer le bris, comme bois sec, d'une antenne filiforme. On est fort surpris alors de voir le fragment distal libéré, subir autour du point de rupture comme charnière un mouvement angulaire, par à-coups brusques, manifestement commandé. Or, en ce lieu, ne sont mobiles que les hémococonies.

Ce corpuscule éjecté nous paraît être l'hémococonie vraie. Le système hémococonial plus ou moins visible sur les préparations de plaquettes par solutions fixatrices usuelles s'impose donc susceptible de dissolution. Tout d'abord il nous paraît convenir d'extraire sphérules et « plaquettes filles », productions organisées dont l'individualité est révélée par gonflement plus ou moins rapide sous l'influence électrolytique, ou toxi-infectieuse comme nous l'avons montré prématurément au contact d'un staphylocoque sous l'aspect de « têtes de Gorgone » [4]. Nous montrerons que ces productions sont, en même temps que vecteurs d'hémococonies, de véritables grappins disposés au-devant de l'envahissement microbien et que les hémococonies sont fort nocives pour les microorganismes et fort sensibles aux toxines.



Quant aux hémococonies de la digestion, sans aucune relation avec la plaquette, elles nous apparaissent dans une certaine individualité de floculats transitoires de nature sérique. Ce qui implique la nécessité de faire toutes nos observations en dehors de la digestion.

La révélation d'un tel système apporte donc une certaine clarté à toute cette organisation passive de défense, décrite antérieurement. En dehors de la constitution des houppes, du film, l'antenne explique clairement le système réticulé tendu au-devant de l'infection que nous montrerons englué peu à peu par précipitation fibrineuse et renforcé par le rôle anti-microbien des productions plaquettaires.

Avec cette morphologie de sensibilité, il n'est point surprenant que l'aspect du système soit fonction de l'état du sérum.

**SÉRUMS NORMAUX.** — Les plaquettes sont à antennes simples, à productions plutôt rares. En nombre, le champ apparaît riche d'antennes moyennes et tend à prendre un bel aspect réticulé.

**SÉRUMS PATHOLOGIQUES.** — On observe à la suite d'incidents toxiques (antibiothérapie) ou toxi-infectieuses :

a) Sous l'influence directe du toxique : fréquence des plaquettes composées ou géantes, richesse en productions libres, sphérules surtout, qui encombrant le champ et voguent dans un semis d'hémococonies d'une densité parfois extraordinaire.

b) A distance, des mois après, les productions libres restent souvent nombreuses, mais les hémococonies sont très raréfiées. Les plaquettes fournies d'antennes sont rares et ces antennes sont souvent courtes, irrégulières. D'où l'aspect d'irrégularité, de manque de cohésion du réseau, bien fourni de plaquettes, de l'anse de 7 mm.

*En résumé*, sous certaines conditions la plaquette se révèle un organisme composé d'antennes porteuses de productions très sensibles aux influences toxiques et jouant un rôle considérable dans l'organisation de la défense passive contre l'infection.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUCHON (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 696.  
[2] DUCHON (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 100.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Etude de l'action des rayons ultraviolets sur le système lyso-gène *Escherichia coli* K12 (lambda), K12S, lambda**, par H. MARCOVICH.

**La « restauration par voisinage » chez des bactéries irradiées par des rayons X**, par M<sup>lle</sup> B. DELAPORTE.

Quelques aspects de la multiplication du virus de la mosaïque du tabac en culture de tissus, par L. HIRTH et G. SEGRETAİN.

Résultats comparatifs des séro-neutralisations et des titrages du virus poliomyélitique exécutés par microméthode sur plaques en matière plastique et par la méthode classique sur tubes, par P. LÉPINE, G. BARSKI et M<sup>lle</sup> F. CORNEFERT.

## AVIS

### COURS DE TECHNIQUES DES CULTURES CELLULAIRES EN VIROLOGIE

Institut Pasteur, 12-20 octobre 1956.

Une session d'enseignement théorique et pratique des méthodes de cultures cellulaires appliquées aux recherches et au diagnostic des maladies à virus aura lieu au Service des Virus de l'Institut Pasteur, du 12 au 20 octobre 1956.

*Principaux sujets traités* : Matériel et méthodes ; Préparation des milieux de culture : milieux naturels, milieux synthétiques, milieux enrichis. Tissus et cellules : explants primaires, lignées cellulaires continues ; cellules normales, cellules tumorales. Extraction des organes ou embryons d'animaux : trypsination des cellules, numération des suspensions cellulaires, obtention de couches monocellulaires. Cultures en tubes stationnaires, en tubes roulants ou en bouteilles ; cultures en masse ; méthode de Dulbecco et méthodes dérivées. Isolement, titrage, typage de divers virus ; recherche et titrage des anticorps spécifiques par neutralisation. Actions cytopathogènes, lésions cellulaires et inclusions ; observation microscopique directe ou après coloration ; applications à la microscopie électronique.

Le nombre des participants sera limité à 20. Le cours comprendra des exposés suivis d'exercices et travaux de laboratoire.

*Droit d'inscription* : 8 000 frs à verser à l'Econome de l'Institut Pasteur après confirmation de l'inscription. Pour tous renseignements et inscription s'adresser au D<sup>r</sup> P. Lépine, Service des Virus, Institut Pasteur, 25, rue du D<sup>r</sup>-Roux, Paris-15<sup>e</sup>.



La « 4th International Instruments and Measurements Conference » aura lieu à Stockholm du 15 au 23 septembre 1956.

Pour tous renseignements s'adresser à : The Royal Swedish Academy of Engineering Sciences, Stockholm, ou à : The Swedish Association of Technical physicists, Stockholm, Suède.

La XIV<sup>e</sup> Conférence Internationale de la Tuberculose aura lieu à New Delhi, Inde, du 7 au 11 janvier 1957.

Pour tous renseignements s'adresser au Secrétariat de l'Union Internationale contre la Tuberculose, 15, rue Pomereu, Paris-16<sup>e</sup>.

## LIVRES REÇUS

- A. Winkler. — *Die Bakterienzelle. Ein Ueberblick über den gegenwärtigen Stand unseres Wissens.* 1 vol., 124 p., 10 pl. hors texte. G. Fischer Verlag édit., Stuttgart, 1956. Prix : DM 11,50.

Comme l'indique son titre, ce petit livre n'est qu'un résumé de ce que nous savons actuellement sur la question. Il étudie successivement les diverses parties d'une bactérie : membrane, capsule, flagelles, nucléoïdes cytoplasme, spores, formes L, donnant pour chaque sujet quelques références bibliographiques. Un dernier chapitre est consacré aux manipulations pratiques : examen aux microscopes optique, électronique et en contraste de phase, techniques de fixation, de coloration, etc. Des planches hors texte comprenant chacune plusieurs photomicrographies, montrent divers aspects des différentes bactéries aux microscopes optique et électronique.

H. T.

- J. Meyer-Rohn. — *Untersuchungen zur Chemotherapie der Hauttuberkulose. Verwertbarkeit kultureller und tiereperimenteller Ergebnisse.* 1 vol., VIII + 81 p., 12 fig., Georg Thieme Verlag édit. Stuttgart, 1956. Prix : DM 9,60.

Dans cette Monographie, faisant partie de la série publiée par le périodique *Der Tuberkulosearzt*, l'auteur expose dans le détail les travaux qui ont été faits à la Clinique de Dermatologie de l'Université de Hambourg. On a procédé à une étude expérimentale de la chimiothérapie de la tuberculose cutanée et recherché l'action de divers produits *in vitro* et sur l'animal (cobaye et souris). Les expériences *in vitro* permettent d'éliminer les corps inactifs. Sont étudiés successivement : la streptomycine, le PAS, la thiosemicarbazone et l'INH. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'INH et certains de ses dérivés, auxquels un chapitre spécial est consacré. Une place spéciale dans la thérapeutique de la tuberculose cutanée doit être faite à la vitamine D<sub>2</sub>, dont le mode d'action reste d'ailleurs inexpliqué. Un bref chapitre consacré à la thérapeutique de la maladie humaine montre que les résultats sont, dans ce cas, semblables à ceux obtenus sur l'animal.

H. T.

- J. Oehme. — *Lues connata.* 1 vol. 114 p., 51 fig., G. Thieme édit., Leipzig, 1956. Prix : relié : 26 DM.

L'auteur apporte le résultat de ses recherches portant sur 1 700 enfants nés de mères syphilitiques et dont 238 présentaient une syphilis congénitale. Le traitement de la maladie dépend du diagnostic précoce, souvent difficile à faire, et de la reconnaissance de la guérison définitive. C'est sur ces aspects de la question que l'auteur a surtout fait porter son étude. Les réactions sérologiques chez le nouveau-né



ne permettent pas toujours le diagnostic. L'auteur a mis au point une technique d'examen du sang veineux du nouveau-né grâce à laquelle on peut éviter certaines difficultés ; les résultats observés sont complétés par l'examen du L. C.-R. La radiographie rend également de grands services. L'auteur discute 700 clichés radiographiques réalisés chez des nourrissons et des enfants. La syphilis congénitale est une maladie évitable par une prophylaxie appropriée, pratiquée surtout avant la naissance. La thérapeutique est surtout représentée par le traitement par la pénicilline, qui donne de bons résultats chez les nourrissons, mais est moins satisfaisante chez les enfants plus âgés. Enfin, un dernier chapitre est consacré aux réactions sérologiques qui permettent de vérifier la guérison clinique. Chaque chapitre comporte une bibliographie assez importante.

H. T.

**J. André.** — *Rapport sur l'activité du FOREAMI durant l'année 1954.*  
1 vol., 214 p., FOREAMI, 14, Square de Meeus, Bruxelles, édit., 1955.

Le FOREAMI (Fonds Reine Elisabeth pour l'Assistance Médicale aux Indigènes du Congo Belge) publie son rapport annuel, dans lequel il expose son organisation, le personnel, les constructions et les moyens de locomotion dont il dispose. Ce rapport, rédigé par le Dr J. André, directeur-adjoint du Fonds en Afrique, décrit ensuite les examens médicaux qui ont été pratiqués, la morbidité, la mortalité, les soins apportés aux indigènes dans les régions étudiées. Un chapitre passe en revue séparément chacune des principales maladies sévissant au Congo Belge : maladie du sommeil, paludisme, pian, lèpre, tuberculose, dysenterie, filarioses, etc. Les conclusions montrent le bénéfice que les indigènes ont tiré des secours qui leur ont été apportés et ce qui reste à faire.

Au rapport sont adjoints cinq articles originaux, rédigés par différents auteurs, sur certains problèmes plus particuliers : lutte antituberculeuse, distribution du lait, anémies à hématies falciformes, travaux d'adduction d'eau, etc.

H. T.

**A. Rippel-Baldes.** — *Grundriss der Mikrobiologie.* 3<sup>e</sup> édit., 1 vol.  
V + 418 p., 160 fig., Springer Verlag, Berlin, 1956. Prix : relié, DM 45.

Cette troisième édition reproduit dans son ensemble le plan des deux premières. Le chapitre concernant les Algues et les Protozoaires a été un peu développé et quelques photographies au microscope électronique ajoutées. L'accent est mis surtout sur la biologie des bactéries (métabolisme, synthèses, etc.) et sur leur rôle dans la nature.

Les titres de quelques ouvrages sur la question et une très brève liste des périodiques de bactériologie sont donnés à la fin du volume.

H. T.

Le Gérant : G. Masson.